

بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره (آب) لیمو ترش بر میکروارگانیسم های دهانی

فاطمه رفیعی¹، رضا رضانی²

1- مربی گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران - ایران

2- کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران - ایران

نویسنده مسؤول: فاطمه رفیعی. گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران - ایران. Rafiee_ar@yahoo.com

دریافت: 91/7/3 پذیرش: 91/9/27

چکیده

زمینه و هدف: این تحقیق در زمینه میکروبیولوژی پزشکی انجام شد. لیمو ترش، میوه رسیده گیاه *C. limonum* از خانواده روتاسه (*Rutaceae*) می باشد که اسانس و عصاره (آب) میوه آن اثرات ضد میکروبی فوق العاده ای علیه میکروارگانیسم ها دارد. هدف از انجام این تحقیق، جایگزینی ماده ای طبیعی به جای داروهای ضد میکروبی و جلوگیری از عوارض آنها، همچنین کاهش مقاومت های آنتی بیوتیکی میکروارگانیسم های مختلف می باشد.

روش بررسی: در این تحقیق اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره لیمو ترش بر میکروارگانیسم های مهم دهانی شامل استرپتوکوکوس سنگوئیس، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پایوژنز، استرپتوکوکوس گروه B، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس فرمتوم، استافیلوکوکوس ارتوس، کاندیدا البیکانس و کاندیدا گلابراتا با تعیین قطر هاله عدم رشد در روش انتشار دیسک و تعیین کمترین غلظت ممانعت کننده رشد و کمترین غلظت کشندگی در روش تهیه رقت، روی محیط مولر هینتون اندازه گیری شد. ابتدا این میکروارگانیسم ها به صورت خالص تهیه و کشت داده شدند. اسانس لیمو از شرکت زردبند یاسوج تهیه گردیده و عصاره آن با دستگاه آبمیوه گیری از لیموی کامل به دست آمد.

یافته ها: باتوجه به نتایج، تفاوت معنی داری بین قدرت ضد میکروبی عصاره و اسانس لیمو ترش وجود ندارد ولی اسانس آن با اختلاف کمی نسبت به عصاره دارای ارجحیت می باشد.

نتیجه گیری: اسانس لیمو را می توان به عنوان یک ماده ضد میکروبی قوی در درمان عفونت های دهانی به کار برد. بنابراین با توجه به رویکرد جهانی به داروهای بیولوژیک، اسانس لیمو ترش می تواند جایگزینی برای آنتی بیوتیک در درمان بسیاری از عفونت ها باشد.

واژه های کلیدی: اثرات ضد میکروبی، لیمو ترش، باکتری های دهانی

بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره (آب)...

مقدمه

اسانس های مرکبات بر باکتری های صنایع غذایی (لاکتوباسیلوس کورواتوس، لاکتوباسیلوس ساکنی و استافیلوکوکوس کارنوسوس) و باکتری های دیگری مانند انتروباکتر گروویا و انتروباکتر آمینگنوس بررسی شده که اسانس های لیمو و گریپ فروت بهترین اثر را داشته اند (12). هدف از انجام این تحقیق، بررسی خواص ضد میکروبی اسانس و عصاره لیمو ترش برای استفاده در بیماری های عفونی دهان به منظور جایگزینی ماده ای طبیعی به جای داروهای ضد میکروبی از جمله آنتی بیوتیک ها و جلوگیری از عوارض آنها و همچنین کاهش مقاومت های آنتی بیوتیکی میکروارگانیسم های مختلف می باشد.

روش بررسی

اسانس و آب لیمو ترش: اسانس خالص لیمو به صورت تجاری از شرکت زردبند یاسوج تهیه گردید و آب لیمو ترش پس از تهیه لیمو تازه جنوب ایران به روش معمولی و با دستگاه آب میوه گیری هم از لیموی کامل با پوست و بدون پوست، آبگیری و در این تحقیق به کار گرفته شد.

سویه های میکروبی: استرپتوکوکوس سنگونیس (PTCC 1449) استرپتوکوکوس موتانس (PTCC 1683) استرپتوکوکوس پایوژنز (PTCC 1447) استرپتوکوکوس گروه B (PTCC 1768) لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC 1608) لاکتوباسیلوس فرمنتوم (PTCC 1638) استافیلوکوکوس ارتوس (PTCC 1112) کاندیدا البیکانس (PTCC 5027) کاندیدا گلابراتا (PTCC 5297) که از کلکسیون میکروبی مرکز تحقیقات عصر انقلاب تهیه شدند.

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره و اسانس لیمو به روش انتشار دیسک (Disk Diffusion): در این روش ابتدا یک سوسپانسیون از باکتری مورد آزمایش تهیه شد که کدورتی معادل 0/5 مک فارلند داشته باشد سپس یک سواب استریل وارد این سوسپانسیون کرده و در داخل لوله به جدار آن نیز فشرده شد تا مایع اضافی آن خارج گردد سپس به طور یکنواخت در سطح محیط کشت به صورت Surface به طریقی که تمام سطوح آن با باکتری پوشانده شود کشت داده

لیموترش میوه رسیده گیاه *Citrus limonum* از خانواده روتاسه (Rutaceae) است که دارای روغن فرار می باشد. اولین بار در کشور های چین و هندوستان پرورش یافته و به تدریج به سایر کشورها وارد شده است در ایران ارقام مختلف آن کاشته می شود نوعی که در شمال می روید «تغان» نامیده شده و در جنوب ایران هم به مقدار وسیعی کاشته می شود (1). لیمو ترش یکی از انواع مرکبات بوده که به دلیل داشتن ویژگی های مهم حائز اهمیت فراوانی است، این میوه به دلیل داشتن میزان بالایی از اسید های آلی به ویژه اسید سیتریک و ایجاد شرایط اسیدی در درمان بسیاری از عفونت های روده ای به کار می رود و کاربرد وسیعی در اپیدمی های بیماری وبا در مناطق مختلف جهان داشته است زیرا خاصیت ضد میکروبی بالایی را نسبت به باکتری مولد این بیماری یعنی ویبریو کلرا دارد (2، 3).

اسانس لیموترش که از فشردن قسمت خارجی پوست لیمو ترش تازه به دست می آید حاوی 92-95 درصد از ترپن های مختلف است. قسمت اعظم آن را لیمون همراه با فلاندرن، کامفن، پی نن تشکیل می دهد. بوی مطبوع اسانس لیمو مربوط به وجود سیترال است که به مقدار 4-7 درصد در آن یافت می شود. به علاوه دارای ژرانیول آزاد، لینالول، سیترونلول و به مقدار کم از آلدئید نونیلیک و اسید آنترانیلیک است (4، 5).

لیمو ترش منبع غنی از ویتامین ث بوده که یکی از مهمترین آنتی اکسیدان های شناخته شده می باشد طوری که این ویتامین نقش مهمی در جلوگیری از پیشرفت بیماری آترواسکلروز، سرطان، امراض قلبی و عفونت ها دارد. لیمو ترش دارای ماده ای به نام ترپین است که تولید کلسترول در بدن را کنترل می کند و مانع افزایش زیاد آن می شود و از سایر فواید آن می توان به مواردی همچون بالا بردن عملکرد سیستم ایمنی بدن، تصفیه کننده خون، نقرس، چاقی، دفع رسوبات ادراری و صفراوی، یرقان، مالاریا، استفاده در محل زیدگی حشرات، ضد تیفوس، ضد سرخک، مخمک، روشن کننده پوست و... اشاره کرد (6، 7).

قابل ذکر است مطالعات بسیاری در مورد اثرات ضد میکروبی عصاره لیمو بر ویبریو فراوانی انجام شده است (8، 9). در برخی مطالعات، سمیت اسانس های مختلف از جمله اسانس لیمو ترش علیه قارچ ها (11) و باکتری های فاسدکننده غذا (12) بررسی شده است. در مطالعه دیگری اثر تعدادی از

تهیه شده باعث رقیق شدن محیط کشت نشود، سوسپانسیون میکروبی با محیط کشت براث تهیه گردید، به این صورت که میزان باکتری تلقیحی در این روش بایستی 106 CFU/mL - 105 باشد، لذا چنانچه یک میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی که کدورتی معادل نیم مک فارلند دارد به 100 میلی لیتر محیط کشت براث اضافه گردد، تعداد 106 CFU/mL باکتری در غلظت نهایی به دست می آید. سپس به اندازه 100 میکرولیتر از این محیط کشت حاوی باکتری به هر خانه به جز دو خانه شاهد که جهت بررسی عدم آلودگی میکروبی اسانس و جهت استریل بودن محیط کشت بود افزوده شد. سپس پلیت فوق به مدت 24 ساعت در دمای 37°C گرمخانه گذاری گردیده سپس چاهکها براساس رشد و یا عدم رشد میکروارگانیسم ها از بالاترین غلظت ماده ضد میکروبی بررسی و آخرین چاهکی که بعد از آن باکتری شروع به رشد کرده بود به عنوان کمترین غلظت ممانعت کننده (MIC) انتخاب و غلظت ماده ضد میکروبی به کار رفته در چاهک فوق ثبت گردید. لازم به ذکر است جهت بررسی صحت عملکرد، هر کدام از آزمایشات دو بار تکرار شدند. سپس برای تعیین کمترین غلظت کشنده (MBC) از کلیه چاهک ها کشت مجدد داده و پس از 24 ساعت گرمخانه گذاری نتایج بر اساس رشد و یا عدم رشد بررسی و ثبت گردید. لازم به ذکر است که دمای گرمخانه گذاری برای باکتری استریپتوکوکوس گروه B، 37 درجه سانتی گراد و برای کاندیدا، 25 درجه سانتی گراد در محیط کشت های متفاوت در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج به دست آمده از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره لیمو ترش و اسانس آن به روش انتشار دیسک نشان داد که هر دو، قدرت اثر ضد میکروبی یکسان داشته و تفاوت معنی داری بین قدرت اثر ضد میکروبی عصاره لیمو ترش با اسانس آن وجود ندارد (جدول شماره 1 و 2).

همچنین نتایج به دست آمده از تعیین MIC و MBC اسانس و عصاره لیمو ترش نیز نشان داد که خاصیت ضد میکروبی عصاره لیمو و اسانس آن، تفاوت معنی داری با هم ندارد (جدول شماره 3 و 4). قابل ذکر است اسانس لیمو ترش نسبت به عصاره آن در درمان بیماری های دهانی با توجه به اختلاف اثر کمی که با هم دارند دارای ارجحیت می باشد (جدول شماره 1، 2، 3 و 4).

پاییز 91، دوره چهارم، شماره چهاردهم

شد. برای انجام این آزمایش از پلیت هایی با قطر 100mm استفاده و حداکثر 6 دیسک روی آن با فاصله 15 mm از دیواره پلیت قرار داده شده و فاصله مرکز دو دیسک از هم 24mm در نظر گرفته شد تا از تلاقی هاله های عدم رشد جلوگیری گردد. سپس دیسک های شاهد استریل حاوی غلظت های مختلف عصاره و اسانس (32، 16، 8، 4، 2، 1 مایکرولیتر به وسیله سمپلر روی هر دیسک قرار داده شد) و آب به عنوان شاهد تهیه و به وسیله پنس استریل در سطح آگار قرار داده و به آرامی فشار داده شد تا با سطح آگار به طور کامل تماس پیدا کرده و به آن بچسبد. پلیت ها را در شرایط ایتیمم از نظر دما، زمان و... (18-24h در دمای 37°C) در انکوباتور قرار داده و بعد از انکوباسیون نتایج براساس قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط کش برحسب میلی متر اندازه گیری و ثبت گردید (6).

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره و اسانس لیمو به روش تهیه رقت (Broth Microdilution): جهت تعیین حداقل میزان ممانعت کننده (Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل میزان کشنده (Minimum Bacteriocidal Concentration) نمونه ها از روش تهیه رقت استفاده شد (8). در یک پلیت 96 خانه ای ابتدا در شش ردیف آن، مقدار 72 میکرولیتر و 9 ردیف افقی دیگر پلیت، 100 میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث استریل (دو برابر غلظت) افزوده شد. سپس جهت تعیین غلظت های مختلف از عصاره و اسانس لیمو 128 میکرولیتر عصاره و اسانس لیمو به طور جداگانه با سمپلر استریل به شش ردیف اول افزوده شد. سپس با سمپلر استریل 100 میکرولیتر از خانه اول برداشته و به خانه دوم افزوده شد. این روش تا خانه هشتم با سر سمپلر های استریل مختلف انجام شد. در انتها 3 خانه یکی به عنوان شاهد رشد باکتری (فقط حاوی $100\mu\text{L}$ محیط کشت $100\mu\text{L}$ از Stock باکتری) جهت بررسی رشد میکروارگانیسم، دومی به عنوان شاهد ماده ضد میکروبی (فقط حاوی $100\mu\text{L}$ محیط کشت و $100\mu\text{L}$ اسانس و یا عصاره لیمو) جهت بررسی عدم آلودگی میکروبی اسانس و عصاره و سومی به عنوان شاهد محیط کشت که فقط حاوی محیط کشت می باشد، جهت اطمینان از استریل بودن محیط کشت استفاده شد. ضمناً یک کنترل منفی هم که فقط شامل آب بود در نظر گرفته شد. پس از تهیه غلظت های مختلف عصاره و اسانس در چاهکها، سوسپانسیون میکروبی برابر نیم مک فارلند تهیه شد؛ به دلیل اینکه سوسپانسیون میکروبی

بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره (آب) ...

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره و اسانس لیموبه روش تهیه رقت: میزان MIC و MBC به دست آمده توسط عصاره و اسانس لیمو در مورد میکروارگانیسم های مورد نظر به شرح جداول شماره 3 و 4 می باشد.

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره و اسانس لیمو ترش به روش انتشار دیسک: نتایج به دست آمده به روش انتشار دیسک شامل قطر هاله های عدم رشد غلظت های مختلف عصاره و اسانس لیمو به شرح جداول شماره 1 و 2 می باشد.

جدول 1. قطر هاله عدم رشد غلظت های مختلف عصاره لیمو بر حسب میلی متر

غلظت آب لیمو (μl)	32	16	8	4	2	1	میکروارگانیسم
استرپتوکوکوس سنگونئیس	18	15	11	-	-	-	
استرپتوکوکوس موتانس	18	14	9	-	-	-	
استرپتوکوکوس پایوژنز	15	10	9	-	-	-	
استرپتوکوکوس گروه B	17	13	8	-	-	-	
لاکتوباسیلوس کازئی	20	16	14	8	-	-	
لاکتوباسیلوس فرمنتوم	20	16	14	8	-	-	
استافیلوکوکوس ارتوس	23	20	15	11	-	-	
کاندیدا البیکانس	17	15	14	-	-	-	
کاندیدا گلابراتا	17	15	14	-	-	-	

جدول 3. میزان MIC و MBC عصاره لیمو بر حسب میکرولیتر در میلی لیتر

میکروارگانیسم	MBC (μl/ml)	MIC (μl/ml)
استرپتوکوکوس سنگونئیس	16	8
استرپتوکوکوس موتانس	32	16
استرپتوکوکوس پایوژنز	32	16
استرپتوکوکوس گروه B	16	8
لاکتوباسیلوس کازئی	8	4
لاکتوباسیلوس فرمنتوم	8	4
استافیلوکوکوس ارتوس	8	4
کاندیدا البیکانس	16	8
کاندیدا گلابراتا	16	8

جدول 2. قطر هاله عدم رشد غلظت های مختلف اسانس لیمو بر حسب میلی متر

غلظت اسانس لیمو (μl)	32	16	8	4	2	1	میکروارگانیسم
استرپتوکوکوس سنگونئیس	23	20	11	8	-	-	
استرپتوکوکوس موتانس	21	16	9	-	-	-	
استرپتوکوکوس پایوژنز	22	17	10	8	-	-	
B استرپتوکوکوس گروه	17	13	8	-	-	-	
لاکتوباسیلوس کازئی	24	18	14	10	-	-	
لاکتوباسیلوس فرمنتوم	24	18	14	10	-	-	
استافیلوکوکوس ارتوس	20	15	12	8	-	-	
کاندیدا البیکانس	17	15	14	-	-	-	
کاندیدا گلابراتا	17	15	14	-	-	-	

جدول 4. میزان MIC و MBC اسانس لیمو بر حسب میکرولیتر در میلی لیتر

میکروارگانیسم	MBC (μl/ml)	MIC (μl/ml)
استرپتوکوکوس سنگونئیس	8	4
استرپتوکوکوس موتانس	16	8
استرپتوکوکوس پایوژنز	8	4
استرپتوکوکوس گروه B	16	8
لاکتوباسیلوس کازئی	8	4
لاکتوباسیلوس فرمنتوم	8	4
استافیلوکوکوس ارتوس	16	8
کاندیدا البیکانس	32	16
کاندیدا گلابراتا	32	16

در غلظت کم اثر سوزانندگی و سمیت سلولی برای انسان دارند، بنابراین هر ماده اسیدی را نمی توان صرف این که ماده ای ضد میکروبی است برای درمان عفونت های دهان به کار برد در حالی که لیمو ترش با این که دارای pH معادل 4/2 می باشد، همیشه به صورت آب لیمو یا خشک شده آن مورد مصرف عموم بوده و هیچگونه عوارضی از آن گزارش نشده است.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان دهنده این مطلب است که اسانس لیمو ترش را می توان به عنوان یک ماده ضد میکروبی قوی در درمان عفونت های دهانی به کار برد. بنابراین با توجه به رویکرد جهانی به داروهای بیولوژیک و طبیعی و اجتناب از داروهای شیمیایی به دلیل داشتن عوارض جانبی مختلف و زیاد، مطالعه روی مواد ضد میکروبی طبیعی که دارای قدرت بالایی می باشند حائز اهمیت بوده و می تواند جایگزین خوبی برای آنتی بیوتیک در درمان بسیاری از عفونت ها باشد که در این طرح اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره لیمو ترش بر میکروارگانیسم های دهان مورد تایید قرار گرفت.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس برای حمایت های مالی و کمک در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی نموده همچنین از جناب آقای حسین جمالی فر که در طول مراحل پروژه بنده را یاری نمودند نهایت سپاسگذاری را دارم.

References

- Zargari A. *Pharmaceutical plants*, Tehran University Publications. 1989;1: 488
- Burt SA. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review*. Inter J Food Microbiol. 2004; 94:223-253.
- Rodrigues A, Sandstrom A, Ca T, Steinsland H, Jensen H, Aaby P. *Protection from cholera by adding lime juice to food—results from community and laboratory studies in Guinea-Bissau*, West Africa. Trop Med Int Health. 2000; 5: 418-422.
- Calabrese V, Randazzo SD, Catalano C, Rizza V. *Biochemical studies on a novel antioxidant from lemon oil and its biotechnological application in cosmetic dermatology*. Drugs Exp Clin Res. 1999; 25:219-225.

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که اسانس و آب لیمو می توانند اثر ضد میکروبی بر روی پاتوژن های مختلف داشته باشند و لیکن قدرت اثر ضد میکروبی اسانس نسبت به آب لیمو کمی بالاست. در این زمینه تحقیقات زیادی در سایر کشورهای جهان نیز صورت گرفته است. Tomotake و همکارانش در سال 2005 اثر ضد میکروبی آب مرکبات مختلف از جمله لیمو را بر روی سویه های باکتری ویبریو بررسی نمودند و به این نتیجه دست یافتند که آب مرکبات بر روی همه سویه های ویبریو به ویژه ویبریو پراهمولیتیکوس خاصیت ضد میکروبی دارد و اسید سیتریک مهمترین اسید آلی موثر در خاصیت بازدارندگی از رشد پاتوژن ها می باشد (8). Decastillo و همکارانش در سال 2000 نیز با بررسی خاصیت ضد میکروبی آب لیمو تازه بر علیه باکتری ویبریو کلرا به نتایج مشابهی دست یافتند (9). Prabuseenivasan و همکارانش در سال 2006 اثر ضد میکروبی اسانس تعدادی از گیاهان دارویی و از جمله اسانس لیمو را بر روی پاتوژن های گرم منفی مثل اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروجینوزا، پروتئوس و لگاریس و پاتوژن های گرم مثبت مثل استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس مورد بررسی قرار دادند (10). در این مطالعه نیز اسانس لیمو دارای خاصیت ضد باکتریایی بر روی پاتوژن های مورد تست بود. Martos و همکارانش در سال 2007 اثر ضد قارچی اسانس لیمو، پرتقال و گریپ فروت را بر روی تعدادی از قارچ ها از جمله آسپرژیلوس نایجر مورد مطالعه قرار دادند و نتایج به دست آمده نشان داد که اسانس این مرکبات می توانند خاصیت ضد قارچی نیز داشته باشند (11). همچنین Martos و همکارانش در تحقیقی دیگر در سال 2008 اسانس مرکباتی همچون لیموترش را بر روی باکتری های مختلف مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که اسانس لیمو می تواند اثر ضد میکروبی بهتری نسبت به سایر مرکبات داشته باشد (12). در این مطالعه نیز با بررسی اثر ضد میکروبی اسانس و عصاره لیمو بر روی پاتوژن های مختلف نتایج مشابهی با موارد ذکر شده به دست آمد به طوری که میزان اثر بازدارندگی اسانس لیمو نسبت به عصاره آن بر روی باکتری های مختلف از جمله استرپتوکوکوس سنگوئیس و استرپتوکوکوس پایوژنز بیشتر بود.

در مقایسه قدرت ضد میکروبی عصاره و اسانس لیمو ترش با اسید های دیگر باید متذکر گردید که بسیاری از اسید ها حتی

5. Manners GD. *Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects*. J Agric Food Chem. 2007; 55(21):8285-94.
6. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. *A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens*. Oral Microbiol Immunol. 2002; 19:61-4.
7. Kawaii S, Tomono Y, Katase E. *Antiproliferative effects of the readily extractable fractions prepared from various citrus juices on several cancer cell lines*. J Agric Food Chem. 1999; 47(7):2509-12.
8. Tomotake H, Koga T, Yamato M, Kassu A, Ota F. *Antibacterial activity of Citrus fruit juices against Vibrio species*. J Nutr sci vitaminol. 2006; 52(2): 157-160.
9. Castillo MC, Allori CG, Gutierrez RC, Saab OA, Fernandez NP, Ruiz *et al*. *Bactericidal activity of lemon juice and lemon derivatives against Vibrio cholerae*. Biol Pharm Bull. 2000; 23:1235-1238.
10. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. *In vitro antibacterial activity of some plant essential oils*. BMC Complement Altern Med. 2006; 6: 39.
11. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. *Antifungal activity of lemon (Citrus lemon L.), mandarin (Citrus reticulata L.), grapefruit (Citrus paradisi L.) and orange (Citrus sinensis L.) essential oils*. J food control. 2008; 19(12): 1130-1138.
12. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. *Antibacterial activity of lemon (Citrus lemon L.), mandarin (Citrus reticulata L.), grapefruit (Citrus paradisi L.) and orange (Citrus sinensis L.) essential oils*. J food safety. 2008; 28(4): 567-576.