

Антимикробное действие масла чайного дерева (*Melaleuca alternifolia*) на микроорганизмы ротовой полости

Ева Кулик, Кристина Ленкайт и Юрг Майер

*Институт профилактической медицины и пероральной микробиологии
Центра стоматологии Базельского университета*

Резюме

Масло Melaleuca alternifolia (чайного дерева) оказывает антимикробное действие на широкий спектр грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и грибов. В данной работе исследовалось in vitro бактериостатическое и фунгицидно/бактерицидное действие раствора масла чайного дерева, нового геля с маслом чайного дерева для перорального применения (Тебодонт®), соответствующего геля с наполнителями без активного вещества, раствора хлоргексидина биглюконата и PlakOut® в отношении 10 различных видов пероральных микроорганизмов. Показатели минимальной подавляющей концентрации (МПК) для раствора масла чайного дерева описывались диапазоном 0,0293%–1,25%. Показатель минимальной бактерицидно/фунгицидной концентрации (МФБК) колебался для раствора чайного дерева в пределах 0,0521 – 2,5% и для геля с маслом чайного дерева в пределах <0,0098% – 3,33%. При этом наиболее чувствительными бактериями были Actinobacillus actinomycetemcomitans, Fusobacterium nucleatum и Porphyromonas gingivalis, тогда как Streptococcus mutans и Prevotella intermedia показали наиболее низкую восприимчивость. Как для раствора хлоргексидина биглюконата, так и для PlakOut® показатели минимальной подавляющей концентрации и минимальной бактерицидно/фунгицидной концентрации находились в пределах <0,0002% – 0,0125%.

Acta Med Dent Helv 5: 125- 130 (2000)

Ключевые слова: масло чайного дерева; *Melaleuca alternifolia*; пероральные бактерии, антимикробный, минимальная подавляющая концентрация.

Принято к публикации: 20 сентября 2000 года

Адрес для контактов:

Ева Кулик,

*Институт профилактической медицины и пероральной микробиологии
Центра стоматологии Базельского университета*

Генбельштрассе 3, 4056 Базель

Тел.: 061/267 2603, факс.: 061/267 2658

Электронная почта: Eva.Kulik@unibas.ch

Введение

Масло чайного дерева получают из листьев *Melaleuca alternifolia*, произрастающего в Австралии кустообразного дерева семейства миртовых. Как природный и эффективный микробиоцид это масло достаточно привлекательно для фармацевтического и косметического применения (обзор см. КАРСОН и РИЛЕЙ, 1993, КАРСОН и соавт. 1998, ГАЛЛЕ-ХОФФМАН и КЁНИГ 1999). Масло чайного дерева состоит примерно из ста терпиненов и их спиртов, из которых терпинен-4-ол, α -пинен, линалоол и α -терпинеол считаются важнейшими компонентами с антимикробным действием (КАРСОН и РИЛЕЙ, 1995, РАМАН и соавт. 1995).

Исследования *in vitro* показали эффективное антимикробное действие масла чайного дерева и его отдельных компонентов на широкий спектр грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и прочих грибов (КАРСОН и РИЛЕЙ, 1995, РАМАН и соавт. 1995, ХАММЕР и соавт. 1996, ХАММЕР и соавт. 1998, МАУДСЛЕЙ и КЕРР, 1999, ХАММЕР и соавт. 2000). В последнее время масло чайного дерева вызывает особый интерес, так как оно обнаружило способность подавлять рост мультирезистентных бактерий. Так, масло чайного дерева *in vitro* действует против таких проблемных бактерий как метициллин-резистентный золотистый стафилококк, резистентных к гликопептидам энтерококкам, резистентным к гентамицину и, продуцирующих β -лактамазы расширенного спектра *Klebsiella*, некоторым мультирезистентным псевдомонадам, а также эффективно для клинического лечения инфекций, вызванных резистентными к флуконазолу *Candida albicans* у пациентов со СПИДом (КАРСОН и соавт. 1995, НЕНОФФ и соавт. 1996, ЧАН и ЛОУДОН 1998, ЯНДУРЕК и соавт. 1998, ЭЛСОН и ГИДЕ 1999, ХАРКЕНТАЛЬ и соавт. 1999, МЭЙ и соавт. 2000). Действие против вирусов человека пока не доказано, но доказано против вирусов растений (БИШОП, 1995, БУРНЕ и соавт. 1999).

В литературе описано многообещающее клиническое применение масла чайного дерева для локальной терапии легких форм угрей, при онихомикозе и бактериальном вагините (БАССЕТТ и соавт. 1990, БЛЕКУЭЛЛ 1991, ХАММЕР и соавт. 1999а, ТОНГ и соавт. 1999).

В стоматологии использование этого эфирного масла в качестве антисептика было предложено еще в начале 20-го века (МАКДОНАЛД 1930). Вместе с тем, опубликовано лишь 2 исследования, посвященных антимикробному действию масла чайного дерева на пероральные микроорганизмы (ШАПИРО и соавт. 1994, ВЕЛШ и ЛОНГСТАФФ 1987).

Хлоргексидин является наиболее часто применяемым средством профилактики и лечения пероральных инфекций. Несмотря на его высокую эффективность, но обладает нежелательными побочными действиями (ДЕНТОН 1991). Поэтому ему ищут альтернативу, в настоящее время – среди природных продуктов.

Целью настоящей работы было исследование бактериостатических или бактерицидно/фунгицидных свойств масла чайного дерева в форме геля

перорального применения (Тебодонт®, фирма Д-р Вильд и Со АГ, Базель) в отношении пероральных микроорганизмов в сравнении с хлоргексидином. Для этого использовался тест с макроразведением, который позволяет определить минимальную подавляющую концентрацию (МПК) и минимальную бактерицидно/фунгицидную концентрацию (МБФК) в отношении микроорганизмов в жидкой среде.

Материал и методы

Микроорганизмы и условия роста

В данной работе исследовались следующие микроорганизмы: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Streptococcus anginosus* ZIB 6006 (клинический изолят Центра стоматологии (ZfZ) Базель), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ZIB 1001 (клинический изолят ZfZ Базель), *Lactobacillus salivarius* подвид *salivarius* DSM 20555, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, *Fusobacterium nucleatum*, ZIB 2001 (клинический изолят ZfZ Базель), *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Porphyromonas gingivalis* ZIB 3071 (клинический изолят ZfZ Базель) и *Candida albicans* ZIB 9100 (клинический изолят ZfZ Базель). Микроорганизмы культивировались при 36 °C на пластинах с человеческой кровью (Columbia Agar Base [BBL Бектон Дикинсон] с добавлением 4 мг/л гема, 1 мг/л менадиона и 50 мл/л человеческой крови) при следующих условиях: факультативно-анаэробные бактерии в воздухе + 10% CO₂ в течение 3-5 дней, анаэробные бактерии в 10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂ в течение 10 дней, *Candida albicans* при аэробных условиях в течение 2 дней.

Микроорганизмы выращивали в следующих жидких средах: бульон Тодда – Гевитта (BBL Бектон Дикинсон) для факультативно-анаэробных бактерий, тиоглюколатная среда (CM 391 Oxoid) с добавлением 4 мг/л гема и 1 мг/л витамина K₃ для большинства анаэробных бактерий, среда Cooked Meat (Oxoid) с добавлением 5 г/л дрожжей (Difco), 5 г/л K₂HPO₄, 1 мг/л резазурина и 0,5 г/л цистеингидрохлорида для *P. intermedia*; колумбийский бульон (BBL Бектон Дикинсон) с добавлением 4 мг/л гема, 1 мг/л витамина K₃ и 50 мл/л человеческой крови для *P. gingivalis*; жидкая среда Сабуро (Oxoid) для *C. Albicans*. Эти среды использовались и в пробах определения МПК и МБФК.

Активные вещества

Масло чайного дерева (партия № 7115, производитель: Main Camp Tea Tree Oil, Баллина, Австралия) было предоставлено фирмой Д-р Вильд и Со, АГ и содержало 37-45% терпинен-4-ола и не более 5% 1,8-синеола. Для улучшения растворимости в водной среде готовился 80% раствор в полисорбате 80 (Sigma-Aldrich Chemie) (ВЕЛШ и ЛОНГСТАФФ 1987, КАРСОН и РИЛЕЙ, 1995).

Дополнительно исследовался гель, содержащий 10% масла чайного дерева (из масла партия № 7115) и соответствующий гель с наполнителями (Д-р Вильд и Со, АГ, содержащий воду, глицерин, натрий

карбоксиметилцеллюлезу, сахарин натрия, гидрированное касторовое масло, метанол и апельсиновое масло) без активного вещества. Контролем служил 10% хлоргексидина биглюконат (больничная аптека в Базеле) и гель Plak-Out® (Hawe-Neos Dental, Швейцария).

Проверяемые вещества исследовались главным образом на отсутствие бактерий.

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) и минимальная бактерицидно/фунгицидная концентрации (МБФК)

Подавление различными активными веществами роста пероральных микроорганизмов определялось с помощью теста макроразведения (NCCLS 1997a, NCCLS 1997b, по ГРЕВЕНИЦУ и соавт. 1987). Для этого из геля с маслом чайного дерева, из геля-плацебо и из геля Plak-Out® готовили исходные растворы 1 г геля на 1 мл 2-концентрированной жидкой питательной среды; для геля с маслом чайного дерева получалась концентрация 5%, а для геля Plak-Out® концентрация хлоргексидина составляла 0,1%. Жидкое масло чайного дерева и хлоргексидин разводили в соответственной жидкой питательной среде до 5% и соответственно 0,2% исходного раствора. Все вещества в 2 этапа дополнительно разводились в жидкой питательной среде. Исследовалось 10 разведений каждого проверяемого вещества.

К 2 мл препарата из каждой серии разведения добавляли 100 мкл культуры микроорганизмов, содержащей около 5×10^6 КОЕ/мл, и инкубировали пробу с аэробными и факультативно-анаэробными бактериями 24 часа, а с анаэробными бактериями 5-10 дней в соответствующих условиях. Количество фактически использованных бактерий проверяли с помощью посева на пластины с человеческой кровью. МПК соответствовало самой низкой концентрации активного вещества, при которой в конце периода культивации визуальное исследование не обнаруживало микробного роста. Для определения МБФК из пробирки, в которой не было отмечено микробного роста, 100 мкл жидкости наносили на пластины с человеческой кровью и культивировали. МБФК соответствовало самой низкой концентрации активного вещества, при которой способность к размножению сохраняли не более 1‰ инокулированных бактерий. Хотя для дрожжевого грибка *Candida albicans* исследовался лишь один пероральный грибок, в этой работе применялось понятие фунгицидной концентрации, так как это общепотребительное в литературе выражение. За несколькими исключениями выполнялось по 3 теста.

Результаты

Полученные показатели МПК и МБФК представлены в табл. I и II. Как раствор, так и гель с маслом чайного дерева обнаружили бактерицидное или бактериостатическое действие в отношении проверяемых микроорганизмов. При этом показатели МПК для раствора масла чайного дерева лежали в пределах 0,0293% – 1,25%, а для геля с маслом чайного дерева 0,0082%–

1,25%; показатель МБФК находился в диапазоне от 0,0521% до 2,5% (раствор масла чайного дерева) и от <0,0098% до 3,33% (гель с маслом чайного дерева).

Табл. 1. Средняя минимальная подавляющая концентрация, %

Микроорганизмы	Исследуемые вещества				
	Раствор масла чайного дерева	Гель с маслом чайного дерева ^а	Гель ^б	PlakOut® ^с	Хлоргексидин
<i>S. mutans</i>	0,2604	0,2084	N	< 0,0002	< 0,0004
<i>S. sanguis</i>	0,1563	0,2604	N	< 0,0003	< 0,0005
<i>S. anginosus</i>	0,1563	0,2084	N	< 0,0002	< 0,0004
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,0293	< 0,0130	0,1302	< 0,0002	< 0,0004
<i>L. salivarius</i>	0,2084	0,2604	N	< 0,0002	< 0,0004
<i>A. naeslundii</i>	0,1302	1,25	N	< 0,0002	< 0,0004
<i>F. nucleatum</i>	0,0846	0,0912	< 0,0358	< 0,0002	< 0,0005
<i>P. intermedia</i>	1,25	1,25	N	0,0125	0,0125
<i>P. gingivalis</i>	0,0651	0,0082	0,0911	0,0027	0,0016
<i>C. albicans</i>	0,1302	0,0456	1,0417	0,0013	0,0009

^а) по отношению к концентрации масла чайного дерева;

^б) по отношению к концентрации геля; N ≥5%;

^с) по отношению к концентрации хлоргексидина.

Табл. 2. Средняя минимальная бактерицидно/фунгицидная концентрация, %

Микроорганизмы	Исследуемые вещества				
	Раствор масла чайного дерева	Гель с маслом чайного дерева ^а	Гель ^б	PlakOut® ^с	Хлоргексидин
<i>S. mutans</i>	1,0417	3,33	N	0,0006	0,0016
<i>S. sanguis</i>	0,4167	0,6250	N	< 0,0005	0,0011
<i>S. anginosus</i>	0,4167	0,5208	N	< 0,0005	0,0008
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,0521	< 0,0098	0,5208	< 0,0002	< 0,0004
<i>L. salivarius</i>	1,5625	0,7292	N	< 0,0002	< 0,0007
<i>A. naeslundii</i>	0,5208	1,25	N	< 0,0002	< 0,0004
<i>F. nucleatum</i>	0,1693	0,1172	0,1693	< 0,0002	< 0,0005
<i>P. intermedia</i>	2,5	1,8750	N	0,0125	0,0125
<i>P. gingivalis</i>	0,0651	0,0130	0,1170	0,0027	0,0016
<i>C. albicans</i>	0,3125	0,2084	N	0,0018	0,0032

^а) по отношению к концентрации масла чайного дерева;

^б) по отношению к концентрации геля; N ≥5%;

^с) по отношению к концентрации хлоргексидина.

Представляет интерес и подавляющее рост или бактерицидное действие геля-плацебо на некоторые микроорганизмы, например, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* и *C. albicans*. При одинаковой концентрации активного вещества гель с маслом чайного дерева в этих случаях был эффективнее раствора масла чайного дерева (синергический эффект). Для сравнения определяли показатели МПК и МБФК раствора биглюконата хлоргексидина и Plak-Out® (препарат с хлоргексидином). Показатели как МПК, так и МБФК были в пределах <0,0002% - 0,0125%, т.е. значительно ниже, чем полученные для масла чайного дерева.

Обсуждение

Масло чайного дерева часто применяют в косметических продуктах в концентрации 2-5% (КАРСОН и соавт. 1995). In vitro 2% концентрация как раствора масла чайного дерева, так и геля с маслом чайного дерева подавляла рост всех 10 видов исследованных пероральных бактерий, и для 9 из 10 из них эта концентрация даже превышала МБФК. Для всех бактерий 5% концентрация масла чайного дерева была выше МБФК. Для сравнения определялись значения МПК и МБК раствора хлоргексидина и Plak-Out® (содержащего 0,2% хлоргексидина) – двух наиболее часто используемых препаратов для уменьшения количества бактерий в пероральной области. Как и ожидалось, 0,2% концентрация хлоргексидина для всех исследованных видов пероральных бактерий была выше МБФК. Определяемые для хлоргексидина показатели МПК были на коэффициент 100-1000 ниже, чем показатели масла чайного дерева и в основном совпадали с сообщаемыми в литературе значениями (ДЕНТОН 1991). Представляет интерес и тот факт, что гель-наполнитель также оказывал подавляющее действие на некоторые микроорганизмы, например, *A. Actinomycescomitans*, *C. albicans* и *F. nucleatum*. На чем основано это действие, неясно. Этот результат может объяснить определенные различия между действием раствора масла чайного дерева и геля с маслом чайного дерева.

Механизм действия масла чайного дерева объясняется содержащимися в нем терпенами (в том числе терпиненом-4-ол). Они проникают в клеточную мембрану микроорганизмов и оказывают токсическое действие на структуру мембраны и ее функции, в результате чего цитоплазматическая мембрана утрачивает способность исполнять свои функции барьера проницаемости (КОКС и соавт. 1998, ГУСТАРЗОН и соавт. 1998, КОКС и соавт. 2000, МАНН и соавт. 2000). О случаях резистентности к маслу чайного дерева пока не известно, хотя широкие исследования по этой теме не проводились.

Масло чайного дерева не мутагенно, а его токсичность с учетом LD₅₀ 1,9 г/кг веса тела для крыс при пероральном приеме можно отнести к умеренной (КАРСОН и РИЛЕЙ, 1993, ФОРД 1988). В литературе сообщалось о случаях контактного дерматита и аллергий при местном нанесении (КНИГТ и ХАНСЕН, 1984, СЕЛЬФААГ и соавт. 1994, КАРСОН и соавт. 1998), ХАУЗЕН и соавт. 1999).

Масло чайного дерева клона 88, нового выведенного сорта с повышенным содержанием активного вещества терпинена-4-ол и пониженным содержанием 1,8-цинеола продемонстрировало in vitro повышенное антимикробное действие, прежде всего против таких проблемных бактерий, как *Pseudomonas aeruginosa* и метициллин-резистентного золотистого стафилококка (МЕЙ и соавт. 2000). Дальнейшие исследования могли бы способствовать выведению растений с еще лучшим антимикробным действием и меньшей способностью вызывать раздражение кожи.

Действие масла чайного дерева на пероральные микроорганизмы исследовалось ВЕЛШЕМ и ЛОНГСТАФФОМ (1987) и ШАПИРО с соавт. (1994). Сопоставление представлено в табл. III. Для сравнимых штаммов бактерий показатели МПК, полученные в настоящем исследовании, чаще всего были между значениями ШАПИРО с соавт. (1994) и ВЕЛША и ЛОНГСТАФФА (1987). Отличия значений МПК могут объясняться тем фактом, что в этих работах использовались другие изоляты бактерий, отличающиеся среды и условия инкубации. Это касается, прежде всего, исследования ВЕЛША и ЛОНГСТАФФА (1987), в котором субоптимальные среды культивирования могли обуславливать полученные этими авторами самые низкие показатели МПК.

Показатели МПК масла чайного дерева для неоральных микроорганизмов также варьируются в различных работах. Это может объясняться использованием других штаммов, различий постановки теста или отличиями препаратов масла чайного дерева (КАРСОН и РИЛЕЙ, 1993, КАРСОН и РИЛЕЙ, 1995, ХАММЕР и соавт. 1998, ГАЛЛЕ-ХОФФМАН и КЁНИГ 1999, МЭЙ и соавт. 2000). Максимальная концентрация полисорбата 80 в этом исследовании составляла 1,25% в культуре. Хотя полисорбат 80 не обладает существенными ингибирующими свойствами для микроорганизмов, нельзя исключить синергистические или антагонистические действия (КАРСОН и РИЛЕЙ 1995, ХАММЕР и соавт. 1999б). Синтетические моющие средства и присутствие органического материала могут увеличивать показатели МПК или МБК для определенных микроорганизмов (ХАММЕР и соавт. 1999б). Но пока не исследовалась возможность влияния таких взаимодействий между применяемым местно маслом чайного дерева и органическим материалом кожи или слизистой оболочки на клиническую эффективность масла чайного дерева.

Используемый в этом исследовании тест с макроразведением не дает информации об эффективности *in vivo* геля с маслом чайного дерева при указанной концентрации. До настоящего момента проведено лишь несколько исследований, которые подтверждают антимикробное действие масла чайного дерева *in vivo* (БАССЕТТ и соавт. 1990, БУК и соавт. 1994, ЯНДУРЕК и соавт. 1998, ТОНГ и соавт. 1999). Так, при легких формах угрей 5% гель с маслом чайного дерева был менее эффективен, чем 5% гель на основе бензоил пероксида, но масло чайного дерева показало лучшую кожную переносимость (БАССЕТТ и соавт. 1990). В другом клиническом исследовании ногти ног 112 пациентов, страдавших онихомикозом, обрабатывали или 100% маслом чайного дерева, или 1% клотримазолом. Через 6 месяцев отсутствовали достоверные отличия клинической оценки обоих способов лечения (БУК и соавт. 1994). У 8 из 12 пациентов с устойчивым к флуконазолу кандидамикозом и ВИЧ, лечение маслом чайного дерева привело к излечению или улучшению ситуации (ЯНДУРЕК и соавт. 1998).

В 2-х исследованиях масло чайного дерева продемонстрировало более сильную активность против транзиторных бактерий, чем против

симбионтной флоры. Это полезная ситуация, поскольку симбионтной флоре приписывают барьерную функцию против колонизации патогенных бактерий (ХАММЕР и соавт. 1996, ХАММЕР и соавт. 1999а), Распространяется ли этот эффект и на применение в пероральной области, из настоящей работы заключить нельзя. С *S. sanquis* и *S. sanguinosus* исследовалось лишь 2 вида пероральных бактерий, которые можно отнести к пероральной симбионтной флоре, но эти виды не имеют особого значения (СЛОТС, 1979, МООРЕ и. МООРЕ 1994).

В этом исследовании определялись показатели МПК и МБФК на планктонной монокультуре. Действие масла чайного дерева на биопленку ротовой полости, образованную зубным налетом, может быть иным. Клинические исследования позволили бы получить ответ на этот вопрос и установить весь спектр возможностей натурального масла чайного дерева в лечении инфекций ротовой полости и пародонтита.

Заключение

Настоящее исследование *in vitro* показало, что 2% раствор масла чайного дерева и разработанный для перорального применения гель с 2% масла чайного дерева (Тебодант®) подавляли рост планктонных монокультур всех 10 исследованных бактерий. Для 9 из 10 этих видов бактерий исследованная концентрация была выше значений минимальной бактерицидно/фунгицидной концентрации, т.е. оказывала уничтожающее действие.

Благодаря демонстрируемому антимикробному действию гель с маслом чайного дерева может рассматриваться в качестве натуральной альтернативы для лечения инфицированной слизистой оболочки рта и пародонта. Но эффективность клинического применения требует дополнительного подтверждения клиническими исследованиями.

Благодарность

Мы благодарим фирму Д-р Вильд и Со, АГ за любезно предоставленные препараты масла чайного дерева и за финансовую поддержку исследования.

Таблица III. Сравнение значений МПК (в %) раствора масла чайного дерева, полученных в настоящем исследовании и в исследованиях ШАПИРО с соавт. (1994) и ВЕЛШ и ЛОНГСТАФФ (1987).

Микроорганизмы	КУЛИС с соавт.	ШАПИРО с соавт.	ВЕЛШ и ЛОНГСТАФФ
Род <i>Streptococcus</i>	0,19 (n=3)	0,6	0,04 (n=2)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,03	0,11	0,02
Род <i>Actinomyces</i>	0,13	0,6	0,05 (n-2)
<i>F. nucleatum</i>	0,08	>0,6	0,02
<i>P. intermedia</i>	1,25	Nb ^a	0,02
<i>P. gingivalis</i>	0,07	0,11	0,02

^a Nb – оценка не проводилась.

Список литературы

- Bassett I B, Panno wrrz D L, Barnetson R S C: A comparative study of tea-tree oil versus benzoyl peroxide in the treatment of acne. *Med J Aust* 153: 455-458 (1990).
- Bishop C D: Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *J Essential Oil Res* 7: 641-644 (1995),
- Blackwell A L: Tea tree oil and anaerobic (bacterial) vaginosis. *Lancet* 337; 300 (1991).
- Bourne K Z, Bourne N, Heising S F, Stanberry L R: Plant products as topical microbiocide candidates: Assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Res* 42: 219-226 (1999),
- Buck D S, Nidorf D M, Addino J G: Comparison of two topical preparations for the treatment of onychomycosis: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and clotrimazole. *J Fam Pract* 38: 601-605 (1994).
- Carson C F, Cookson B D, Farrelly H D, Riley T: Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Antimicrob Chemother* 35:421-424 (1995).
- Carson C F, Riley T V: A review. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Lett Appl Microbiol* 16: 49-55 (1993).
- Carson C F, Riley T V: Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Bacteriol* 78: 264-269 (1995),
- Carson C F, Riley T V, Cookson B D: Efficacy and safety of tea tree oil as a topical antimicrobial agent, *J Hosp Infect* 40:175-178 (1998).
- Chan C H, Loudon K W: Activity of tea tree oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Hosp Infect* 39: 244-245 (1998).
- Cox S D, Gustafson J E, Mann C M, Markham J L, Liew Y C, Hartland R P, Bell H C, Warmington J R, Wyllie S G: Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 26: 355-358 (1998).
- Cox S D, Mann C M, Markham J L, Bell H C, Gustafson J E, Warmington J R, Wyllie S G: The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 88: 170-175 (2000).
- Denton G W: Chlorhexidine. In: Block S S (Ed): *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 4th Edition, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 274-289 (1991).
- Elsom G K F, Hide D: Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to tea tree oil and mupirocin. *J Antimicrob Chemother* 43: 427-428 (1999).
- Ford R A: Fragrance raw materials monographs (tea tree oil). *Food Chem Toxicol* 2: 407 (1988).
- Galle-Hoffman U, Konig W A: Teebaumol. *Dtsch Apoth Ztg* 139: 64-72 (1999).
- Gustafson J E, Liew Y C, Chew S, Markham J, Bell H C, Wyllie S G, Warmington J R: Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 26:194-198 (1998).

- Hammer K A, Carson C F, Riley T V: Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), Am J Infect Control 24: 186-189 (1996).
- Hammer K A, Carson C F, Riley T V: In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. J Antimicrobial Chemother 42, 591-595 (1998).
- Hammer K A, Carson C F, Riley T V: In vitro susceptibilities of Lactobacilli and organisms associated with bacterial vaginosis to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Antimicrob Agents Chemother 43:196 (1999a).
- Hammer K A, Carson C F, Riley T V: Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. J Appl Microbiol 86:446-452 (1999b).
- Hammer K A, Carson C F, Riley T V: In vitro activities of ketoconazole, econazole, miconazole, and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Malassezia* species. Antimicrob Agents Chemother 44: 467-469 (2000).
- Harkenthal M, Reichung J, Geiss I K, Saller R: Comparative study on the *in vitro* antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kanuka oil, and eucalyptus oil. Pharmazie 54: 460-463 (1999).
- Hausen B M, Reichling L Harkeni' HAI. M: Degradation products of monoterpenes are the sensitizing agent in tea tree oil. Am J Contact Dermatitis 10: 68-77 (1999).
- Jandourek A, Vaishampayan J K, Vasques J A: Efficacy of mclaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. AIDS 12: 1033-1037 (1998).
- Knight T E, Hansen B M: *Melaleuca oil* (tea tree oil) dermatitis. J Am Acad Dermatol 30: 423-427 (1994). MacDonald V: The rationale of treatment. Aust J Dent 34:281-285 (1930).
- Mann C M, Cox S D, Markham J L: The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Lett Appl Microbiol 30: 294-297 (2000).
- Maudsley F, Kerr K G: Microbiological safety of essential oils used in complementary therapies and the activity of these compounds against bacterial and fungal pathogens. Support-Care Cancer 7:100-102 (1999).
- May J, Chan C H, King A, Williams L, French G L: Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. J Antimicrob Chemother 45: 639-643 (2000).
- Moore W E C, Moore L V H: The bacteria of periodontal diseases. In: Socransky S S, & Haffajee A D (Eds): Periodontology 2000. Munksgaard, Copenhagen, pp. 66-77 (1994).
- NCCLS: Methods for antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Fourth Edition, NCCLS, Pennsylvania (1997a).
- NCCLS: Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard-Fourth Edition, NCCLS, Pennsylvania (1997b).

- Nenoff P, Haustein U-F, Brandt W: Antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against pathogenic fungi in vitro. *Skin Pharmacol* 9: 388-294 (1996).
- Raman A, Weir U, Bloomfield S F: Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *Lett Appl Microbiol* 21: 242-245 (1995).
- Selvaag E, Eriksen B, Thure P: Contact allergy due to tea tree oil and cross sensitisation to colophony. *Contact Dermatitis* 31: 124-125 (1994).
- Shapiro S, Meier A, Guggenheim B: The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 9: 202-208 (1994).
- Slots J; Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontal* 6: 351-382 (1979).
- Tong M M, Altman P M, Barnetson R S: Tea tree oil in the treatment of tinea pedis. *Trop Med Int Health* 4: 284-287 (1999).
- Von Graevenitz A, Heitz M, Lothy R, Meyer J, Tosch W: Quantitative Empfindlichkeitsbestimmungen für Bakterien. *Schweiz med. Wschr.* 117: 509-517 (1987).
- Walsh L J, Longstaff J: The antimicrobial effects of an essential oil on selected oral pathogens. *Periodontology* 8:11-15 (1987).