

**Влияние органики, катионов и поверхностно-активных веществ
на антимикробную активность масла *Melaleuca alternifolia*
(чайное дерево) in vitro**

K.A. Hammer¹, C.F. Carson¹ и T.V. Riley^{1,2}

¹ Отделение микробиологии, университет Западной Австралии

² Отделение микробиологии и инфекционных болезней медицинского центра патологии и медицинских исследований Западной Австралии им. королевы Елизаветы II, Недлендс, Западная Австралия

K.A. HAMMER, C.F. CARSON AND T.V. RILEY. 1999. Исследовалось влияние определенных органических веществ и условий на антимикробную активность масла *Melaleuca alternifolia* (чайное дерево). Разведением в бульоне и в агаре определялась минимальная ингибирующая и цидальная концентрация масла чайного дерева отдельно и в присутствии посторонних органических веществ. Активность исследовалась в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также к *Candida albicans*. Оценена минимальная ингибиторная и минимальная цидальная концентрации, отличающиеся от контролей на два и более разведения, по отношению к одному или нескольким тестовым микроорганизмам в присутствии таких посторонних веществ, как Твин-20, Твин-80, порошок снятого молока и бычий сывороточный альбумин. Исследование не обнаружило отличий при выполнении анализов в анаэробных условиях, или в присутствии ионов кальция и магния. Влияние органики на антимикробную активность масла чайного дерева исследовалось тестом нейтрализации органического грунта. Исследуемые микроорганизмы подвергались воздействию летальных концентраций масла чайного дерева (начиная от 1,10 об.%) в присутствии сухих пекарских дрожжей 1,30% (мас./об.). После десятиминутного контакта определялась жизнеспособность

микроорганизмов. При уровнях $\geq 1\%$ органика ослабляла активность всех исследуемых концентраций масла чайного дерева по отношению к *Staphylococcus aureus* и *C. albicans*. Что касается *Pseudomonas aeruginosa*, то активность масла чайного дерева ослаблялась при содержании органики более 10%. В экспериментах с *Escherichia coli* органика ослабляла активность концентраций масла чайного дерева 1 и 2%, и не влияла на активность при концентрациях 4 и 8%. Сделан вывод о том, что органические и поверхностно-активные вещества ослабляют антимикробную активность масла чайного дерева, хотя это действие для различных микроорганизмов проявляется в разной степени.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Эфирное масло, получаемое из произрастающего в дикой природе Австралии растения *Melaleuca alternifolia*, называют маслом чайного дерева. Это масло содержит более 100 компонентов, из которых большая часть это монотерпены, сесквитерпены и их спирты (Brophy с соавторами, 1989). Международный стандарт 4730 по маслу мелалеуки терпинен-4-ол типа (масло чайного дерева) приводит хроматографические профили, которые устанавливают максимальное и минимальное процентное содержание 14 компонентов масла (Международная организация стандартизации, 1996 г.). Это позволяет выполнять оценку качества промышленно выпускаемого масла чайного дерева.

Масло чайного дерева применяется местно для лечения различных кожных нарушений, в частности, угрей, опоясывающего лишая, реакций на укусы насекомых и ожоги (Altman 1989), т.к. масло обладает антимикробными свойствами и известными противовоспалительными, проникающими и обезболивающими эффектами (Carson и Riley 1993). Первыми для медицинских целей растение *M. alternifolia* начали применять аборигены племени Бунджалунг в северной части Нового Южного Уэльса, где это растение произрастает в дикой природе (Carson и Riley 1993). Масло с переменным успехом сначала получило распространение в Австралии и сегодня входит в состав многочисленных косметических и фармацевтических

продуктов, выпускаемых во всем мире (Carson и Riley 1993; Knight и Hausen 1994).

Последние исследования масла чайного дерева были сфокусированы на изучении его бактерицидных (Hammer с соавторами, 1996), противогрибковых (Nenoff с соавторами, 1996) и, в меньшей степени, противовирусных свойств этого масла (Bishop 1995). Намного меньше известно о механизме действия масла на микроорганизмы (Gustafson с соавторами, 1998), о потенциальных эффектах других веществ и об условиях, способных влиять на антимикробную активность масла. Несмотря на отсутствие доказательств, получило широкое распространение мнение, что антимикробные свойства масла чайного дерева сохраняются или даже усиливаются в присутствии крови или гноя, которое впервые было высказано Humphrey 1930, Penfold и Morrison 1937. По этой причине было решено оценить различные факторы, способные влиять на эффекты масла, а также антимикробную активность масла чайного дерева к различным микроорганизмам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Масло чайного дерева

Масло чайного дерева (МЧД) для исследований было любезно предоставлено компанией Australian Plantations Pty Ltd, Вираллах/Wyrallah, штат Новый Южный Уэльс (НЮУ), Австралия. Партии 93/04 и 971 соответствовали требованиям стандарта ISO 4730. Содержание определенных компонентов определялось газовой хроматографией и масс-спектрофотометрией в сельскохозяйственном институте Wollongbar Agricultural Institute, Воллонгбар/Wollongbar, шт. НЮУ, Австралия. По результатам исследования партия 93/04 содержала 37,1% терпинен-4-ола и 3,2% 1,8-цинеола. Партия 971 содержала 41,5% терпинен-4-ола, 21,2% γ -терпинена, 10,2% α -терпинена, 3,5% терпинолена, 2,9% α -терпинеола, 2,5% α -пинена, 2,1% 1,8-цинеола и 1,5% п-цимена.

Тестовые микроорганизмы и приготовление инокулята

Микроорганизмы для исследований были получены из коллекций культур отделения микробиологии университета Западной Австралии и из отделения микробиологии и инфекционных болезней Западно-австралийского центра патологии и медицинских исследований. Использовались следующие изоляты: *Acinetobacter baumannii* NCTC 7844, *Aeromonas veronii biogroup sobria* ATCC 9071 (*Aer. sobria*), *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterococcus faecalis* NCTC 8213, *Escherichia coli* NCTC 10418, *Klebsiella pneumoniae* NCTC 11228, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662, *Salmonella enterica subsp. enterica serotype typhimurium* NCTC 74 (*Salm. typhimurium*), *Serratia marcescens* NCTC 1377 and *Staphylococcus aureus* NCTC 6571. Все изоляты поддерживались на кровяном агаре. Ночные культуры готовились инокуляцией 2-3 колоний на 2-3 мл бульона Мюллера-Хинтона (БМХ) с последующей инкубации на протяжении ночи при 35 °C с периодическим встряхиванием. Для анализа разведений в агаре выполнялось разведение ночных культур в физрастворе примерно до 10^6 или 10^7 колониеобразующих единиц (КОЕ) на мл^{-1} для соответственно *C. albicans* и бактерий, что соответствовало примерно 10^3 или 10^4 КОЕ/мл инокуляционного пятна. Для анализа разведений в бульоне выполнялось разведение культур до конечной концентрации инокулята примерно 5×10^5 КОЕ/мл с подтверждением подсчетом количества жизнеспособных микроорганизмов.

Определение МИК и МЦК

Анализ разведений в агаре выполнялись добавлением МЧД (партия 93/04) в двойных разведениях с 2% до 0,03% (об./об.) на агаре Мюллера-Хинтона (АМХ) без или в присутствии исследуемого вещества. Для улучшения растворимости масла все разведения содержали полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат (Твин-20) в конечной концентрации 0,5% (об./об.). В качестве контроля использовался кровяной агар или агар с 0,5% Твин-20, содержащий в зависимости от основного испытания или не содержащий соответствующее исследуемое вещество. Чашки сушились 30 минут и затем при помощи многоточечного репликатора (Mast Laboratories Ltd, Ливерпуль, Великобритания) выполнялась инокуляция четырех инокуляционных пятен каждой изоляты. Чашки инкубировались при 35 °C, после чего определялась

минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для бактерий через 24 часа и для *C. Albicans* через 48 часов. В данном исследовании применялось следующее определение МИК: наименьшая концентрация масла чайного дерева, предупреждающая видимый рост одной или двух колоний. Анализы разведений в агаре в присутствии посторонних веществ выполнялись по одному разу.

Анализы микроразведений в бульоне выполнялись добавлением МЧД (партия 93/04) к БМХ серией двойных разведений с 5% до 0,03% в присутствии каждого исследуемого постороннего вещества и без них. Для улучшения растворимости масла все разведения содержали Твин-20 в конечной концентрации 0,001% (об./об.). Применялись два контроля роста. Один – это БМХ с 0,001% Твин-80 и второй – БМХ с 0,001% Твин-80, плюс соответствующее постороннее исследуемое вещество. Микротитрационные планшеты инокулировались микроорганизмами и инкубировались при температуре 35 °С. После 24 часов в случае исследования бактерий или после 48 часов для *C. albicans* из каждой лунки планшета бралось по 10 мл субкультур и выполнялась пятненная инокуляция на АМХ. После инкубации субкультур определялись МИК и МЦК. В данном исследовании МИК определялась, как наименьшая концентрация масла чайного дерева, вызывающая сохранение или уменьшение инокулята, а МЦК – наименьшая концентрация масла, при которой наступает гибель 99,9% инокулята. Анализы разведений в бульоне выполнялись по два раза. В случае различия результатов, тесты повторялись и брались наиболее вероятные значения.

Эффект анаэробных условий

Анаэробные условия создавались в анаэробной камере (Don Whitley Scientific Ltd, Шипли, Великобритания) с атмосферой 10% H₂, 10% CO₂ и 80% N₂. При приведении анализов разведений в агаре (партия 93/04) выполнялась инкубация в аэробных условиях 48 часов и затем определялись значения МИК. Эти опыты выполнялись по три раза, и бралось наиболее вероятное значение. При анализах разведений в бульоне (партия 971) микротитрационные планшеты помещались в анаэробную камеру не менее чем на 2 часа, и затем выполнялась инокуляция. Сразу после инокуляции планшеты возвращались в анаэробную камеру и субкультуры выращивались на протяжении 24 часов в случае бактерий или 48 часов для *C. albicans*.

Влияние катионов

Готовился бульон Мюллера-Хинтона в жесткой воде, содержащей 0,304 г/л CaCl_2 и 0,065 г/л MgCl_2 (Graham 1978). Кроме того, в БМХ готовились растворы, содержащие 50 ммоль/л Ca^{2+} и (или) Mg^{2+} .

Влияние органических веществ

Исследовались следующие органические вещества (в одной или нескольких концентрациях): овечья кровь (об./об.), лошадиная сыворотка (об./об.), бычий сывороточный альбумин (БСА) (мас./об.), сухие пекарские дрожжи (мас./об.) и порошковое снятое молоко (мас./об.) (Unipath Ltd, Басингсток, Великобритания). Бычий сывороточный альбумин растворяли в дистиллированной воде и после стерилизации фильтрованием добавлялся в стерильную среду. Пекарские дрожжи и порошковое снятое молоко растворяли в БМХ или АМХ и затем стерилизовали в автоклаве.

Влияние поверхностно-активных веществ

После стерилизации среды в автоклаве в асептических условиях (расчет об./об.) добавлялись следующие посторонние вещества: Твин-20, Твин-80 и алкилдиметилетаин (АДБ) (Empigen BB) (Albright и Wilson, Wetherill Park, НЮУ, Австралия). В БМХ растворяли монододецилсульфат натрия (МСН) (мас./об.) и затем выполняли автоклавирование.

Метод Уайтмора-Минера

Предварительно проводились эксперименты по определению количества масла чайного дерева, полностью убивающего весь инокулят согласно параметрам методики Уайтмора и Минера (Whitmore и Miner, 1976). Микроорганизмы инокулировались в растворы масла чайного дерева (партия 971) следующих концентраций (% об./об.): 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 и 10. Инкубация, субкультивирование и регистрация роста выполнялись согласно приведенному ниже описанию. Эта процедура повторялась в другие дни до

тех пор, пока для каждого микроорганизма не подбирались наиболее вероятная минимальная летальная концентрация (МЛК). После этого выполнялись тесты нейтрализации органического грунта при значениях концентрации МЧД больше или равно МЛК соответствующего микроорганизма.

Сухие пекарские дрожжи измельчались до однородной консистенции по описанию Уайтмора и Минера (1976) и в стеклянных сосудах Маккартни взвешивались следующие количества дрожжей: 3, 2, 1, 0,5 и 0,1 г. После автоклавирования образовавшиеся комки разбивались вихревой мешалкой. В стерильной дистиллированной воде готовились растворы МЧД с конечной концентрацией Твин-80 0,001%. Через точно отмеренные интервалы времени 10 мл раствора МЧД добавлялось к каждой порции сухих дрожжей, смесь перемешивалась вихревой мешалкой и 2 часа инкубировалась при 25 °С в водяной бане. Каждая серия включала контрольный раствор МЧД без дрожжей. Через 2 часа по 100 мкл суспензии с примерно 10^8 КОЕ/мл *Staph. aureus*, *E. coli* или *Ps. aeruginosa*, или 10^7 КОЕ/мл при исследовании *C. albicans* с заданной периодичностью инокулировались на серии смеси дрожжи/МЧД. Содержимое всех пробирок непосредственно до и после инокуляции перемешивалось вихревой мешалкой. Пробирки возвращались в водяную баню, и через 10 минут бралось по 1 мл смеси дрожжи/МЧД/микроорганизм и добавлялось в 9 мл питательного бульона №2 (ПБ №2). Из этой начальной субкультуры в ПБ №2 готовилось два дополнительных разведения одного из 10 последовательных разведений. Пробирки с субкультурами инкубировались 48 часов при 35°С. После этого отмечалась мутность бульона и на питательный агар (ПА) выполнялась пятненная инокуляция 25 мкл аликвотных проб из каждой пробирки. После инкубации чашек ПА отмечалось наличие или отсутствие роста. Рост любой субкультуры фиксировался как общий положительный результат. Тесты с каждым исследуемым микроорганизмом выполнялись не менее двух раз в разные дни. Бралось наиболее вероятное значение положительного или отрицательного роста каждой смеси дрожжи/МЧД/микроорганизм. Число нейтрализации рассчитывалось умножением на 10 максимального количества дрожжей, не показавших роста во всех пробирках с субкультурами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние анаэробных условий

Как видно из таблицы 1, значения МИК и МЦК полученные в аэробных и анаэробных условиях отличались не более, чем на одно разведение.

Анализы разведений в бульоне и в агаре

Результаты анализов разведений в бульоне и в агаре в присутствии посторонних исследуемых веществ показаны в таблице 2. Анализы с добавлением Твин-80 для *A. baumannii*, *Aer. sobria*, *Ent. faecalis*, *E. coli* и *Staph. Aureus* показали МИК на два последовательные разведения больше контроля. Остальные значения МИК были равны или отличались на одно разведение. Результаты анализов микроразведений в бульоне в присутствии посторонних веществ показаны в таблице 3. Значения МИК и МЦК в присутствии катионов были равны или отличались на одно разведение. Для *Staph. aureus* МЦК в присутствии БСА и снятого молока были больше на два разведения. Для *C. albicans* МИК в присутствии БСА были больше на два разведения. Для *C. albicans* МИК и МЦК в присутствии 10% Твин-20 были больше также на два разведения. Все значения МИК и МЦК в присутствии 5% и 10% Твин-80 были больше на два разведения, за исключением МИК и МЦК для *E. coli* и МЦК для *C. albicans* в присутствии 5% Твин-80. Поверхностно-активные вещества МСН и АДБ препятствовали росту определенных тестовых микроорганизмов.

Метод Уайтмора-Минера

Результаты экспериментов по Уайтмору-Минеру показаны в таблице 4. Были получены следующие значения МЛК: для *E. coli* 0,5%, *Staph. aureus* 4,0%, *Ps. aeruginosa* 1,0% и для *C. albicans* 2,0%. Присутствие дрожжей ослабляло летальные эффекты двух и более концентраций МЧД по отношению к тестовым микроорганизмам. Так, летальные для *Staph. aureus* и *C. albicans* концентрации МЧД в присутствии 0,1 г дрожжей не убивали эти микроорганизмы.

Таблица 1. Значения МИК и МЦК (% об./об.) масла чайного дерева для различных микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях по результатам анализов разведений в агаре и бульоне.

Микроорганизм	Разведения в агаре		Разведения в бульоне			
	Аэробные условия	Анаэробные условия	Аэробные условия	Анаэробные условия	Аэробные условия	Анаэробные условия
	МИК	МИК	МИК	МЦК	МИК	МЦК
<i>Aeromonas sobria</i>	0,25	0,25	0,25	0,25	0,12	0,25
<i>Candida albicans</i>	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0	1,0	4,0	>4,0	2,0	>4,0
<i>Escherichia coli</i>	0,25	0,25	0,12	0,12	0,25	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5
<i>Serratia marcescens</i>	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0

Таблица 2. Значения МИК (% об./об.) масла чайного дерева, полученные методом разведений в агаре отдельно и в присутствии 5% посторонних веществ с потенциальным влиянием на МЧД.

Микроорганизм	Отдельно МЧД	Твин-20	Твин-80	Овечья кровь	БСА	Пекарские дрожжи
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,25	0,5	1,0	н.о.*	0,5	0,5
<i>Aeromonas sobria</i>	0,25	0,5	1,0	н.о.	0,5	0,5
<i>Candida albicans</i>	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0	0,5	>2,0	2,0	1,0	2,0
<i>Escherichia coli</i>	0,25	1,0	1,0	0,25	0,5	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>2,0	>2,0	>2,0	н.о.	>2,0	>2,0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5
<i>Serratia marcescens</i>	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	0,5	2,0	0,5	0,5	1,0

* н.о. – не определено.

При концентрации МЧД меньше 4%, дрожжи ослабляли летальные эффекты МЧД на *E. coli*, однако при концентрации больше 4% наличие дрожжей не оказывало ослабляющего действия на летальность МЧД. Что касается *Ps. aeruginosa*, то концентрации МЧД 2% и 4% в присутствии $\geq 0,1$ г дрожжей не обеспечивали гибели инокулята. Тесты с *C. albicans* при концентрациях МЧД 8% и 10% показали невоспроизводимые результаты, поэтому выбрать наиболее вероятное значение не удалось. Наблюдался рост

Staphylococcus aureus в пробирках с субкультурой в присутствии количеств МЧД более МИК (0,25%) и МВС (0,5%), но лишь в тех тестах, в которых количество дрожжей составляло 1, 2 или 3 г (данные не показаны). Во всех субкультурах, содержащих МЧД в количествах выше соответствующих значений МИК или МЦК рост *Escherichia coli* и *C. albicans* не наблюдался. Все микроорганизмы в одном или нескольких опытах показали рост при последовательном разведении 10^{-3} , а при разведениях 10^{-1} и 10^{-2} рост отсутствовал. Добавление последовательного разведения 10^{-4} не улучшило восстановления микроорганизмов, т.к. если рост происходил при разведении 10^{-3} , то он был неизбежен и при разведении 10^{-4} .

ОБСУЖДЕНИЕ

В представленном сниманию читателя исследовании изучалось влияние различных посторонних веществ и условий на антимикробную активность масла чайного дерева. Эксперименты показали, что присутствие катионов или анаэробные условия не оказывают негативного влияния, но присутствие поверхностно активных веществ и органического материала ухудшает эффективность МЧД.

Влияние катионов на активность антимикробных соединений может объясняться образованием хелатов между ионами и антимикробным веществом, а также защитой внешних мембран бактерий от потери катионов под влиянием антимикробного агента (Marshall и Piddock 1994). Предполагалось, что анаэробные условия могут усилить антимикробную активность МЧД за счет химической перестройки компонентов масла в более активные антимикробные соединения, или же за счет изменения микробного метаболизма, затрагивающего поглощение и (или) активацию МЧД (Park с соавторами 1992). Однако обнаруженное в данном исследовании отсутствие влияния этих условий на антимикробную активность заставляет предположить отличающееся от указанных механизмов действие МЧД.

Известна способность поверхностно-активных веществ ослаблять активность многих антимикробных веществ, и они давно применяются в качестве стандартных нейтрализаторов фенолов, крезолов и четвертичных аммониевых соединений (Bloomfield 1991; Russell с соавторами, 1992). ПАВ

также ослабляют активность эфирных масел (Remmal с соавторами 1993), включая и масло чайного дерева (Carson и Riley 1996). Предполагается, что ПАВ влияют на антимикробную активность растворяющих молекул антимикробного вещества заключая их внутри мицелл ПАВ, в результате чего ограничиваются возможности антимикробного вещества воздействовать на микроорганизмы (Allwood и Shaw 1987; Russell с соавторами, 1992). Также было продемонстрировано, что в достаточно высоких концентрациях некоторые ПАВ сами способны оказывать летальное действие на микроорганизмы (Russell и Chopra 1990).

Таблица 3. Значения МИК и МЦК (% об./об.) масла чайного дерева, полученные методом микроразведений в бульоне отдельно и в присутствии посторонних веществ с потенциальным влиянием на МЧД.

Тест	Концен-трация	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Candida albicans</i>	
		МИК	МЦК	МИК	МЦК	МИК	МЦК
Отдельно МЧД		0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5
Жесткая вода		0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5
Mg ²⁺	50 ммоль/л	0,25	0,5	0,12	0,12	0,12	0,25
Ca ²⁺	50 ммоль/л	0,25	1,0	0,25	0,25	0,25	0,5
Mg ²⁺ и Ca ²⁺	50 ммоль/л	0,25	0,5	0,25	0,25	0,12	0,25
БСА	10%	0,5	2,0	0,5	0,5	1,0	1,0
Снятое молоко	10%	0,5	2,0	0,25	0,5	0,25	0,5
Пекарские дрожжи	5%	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	1,0
Лошадиная сыворотка	5%	0,12	0,25	0,12	0,12	0,12	0,25
	10%	0,12	0,25	0,12	0,12	0,25	0,5
Твин-20	5%	н.о.	н.о.	0,5	0,5	0,5	1,0
	10%	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	1,0	2,0
Твин-80	5%	2,0	2,0	0,5	0,5	1,0	1,0
	10%	2,0	>4,0	2,0	2,0	2,0	4,0
МСН	1%	О.р.	О.р.	0,25	0,25	О.р.	О.р.
	5%	О.р.	О.р.	0,25	0,25	О.р.	О.р.
	10%	О.р.	О.р.	0,25	0,25	О.р.	О.р.
АДБ	1%	О.р.	О.р.	0,25	0,25	О.р.	О.р.

О.Р. – отсутствие роста.

н.о. – не определено.

Результаты анализов микроразведений в бульоне и экспериментов по Уайтмору-Минеру показали, что органика ослабляет антимикробную активность МЧД. Одним из объяснений этого явления может быть

взаимодействие между органическим веществом и активными участками антимикробного вещества, сопровождающееся снижением концентрации активного антимикробного вещества (Gorman и Scott 1980). Если имеет место именно такое взаимодействие, то должно было происходить одинаковое ослабление активности по отношению ко всем исследуемым микроорганизмам. Однако анализ разведений в бульоне показал, что ни одно исследуемое органическое вещество отдельно не ослабляло активности МЧД к трем тестовым микроорганизмам. Это заставляет предположить, что если и имеет место именно этот механизм ослабления антимикробной активности, то он проявляется согласованно с другими специфическими для микроорганизмов факторами. На такие специфические для микроорганизмов факторы также указывают отличия результатов разных микроорганизмов, наблюдаемые в экспериментах по Уайтмору-Минеру. Специфичность по отношению к микроорганизмам можно объяснить гидростатическим сцеплением органического вещества с микробной клеткой, которое защищает клетку от воздействия антимикробного агента (Gorman и Scott 1980; Gorbach с соавторами, 1992; Russell с соавторами, 1992). Кроме того, возможно, упоминаемое выше взаимодействие между органическим и антимикробным веществами приводит к образованию форм, которые хуже поглощаются некоторыми микроорганизмами (Bean 1967).

Таблица 4. Рост микроорганизмов в субкультурах после экспозиции масла чайного дерева (% об./об.) в присутствии разных количеств дрожжей.

Микроорганизмы	Масло чайного дерева (%)	Содержание дрожжей (г) в 10 мл раствора масла чайного дерева.						Число нейтрализации
		0	0,1	0,5	1,0	2,0	3,0	
<i>Candida albicans</i>	2,0		+	+	+	+	+	
	4,0	–	+	+	+	+	+	–
	6,0	–	+	+	+	+	+	–
<i>Escherichia coli</i>	1,0	–	–	+	+	+	+	1
	2,0	–	–	–	–	+	+	10
	4,0	–	–	–	–	–	–	>30
	8,0	–	–	–	–	–	–	>30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,0	–	+	+	+	+	+	–
	4,0	–	+	+	+	+	+	–
	6,0	–	–	+	+	+	+	1
	8,0	–	–	–	+	+	+	5
	10,0	–	–	+	+	+	+	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0	–	+	+	+	+	+	–
	6,0	–	+	+	+	+	+	–
	8,0	–	+	+	+	+	+	–
	10,0	–	+	+	+	+	+	–

–: отсутствие роста во всех разведениях субкультур;

+: рост в одной или нескольких разведениях субкультур.

Это исследование показало, что лишь органика определенных типов влияет на антимикробную активность МЧД. Ранее подобный эффект уже наблюдался, и предполагалось, что эти различия могут быть обусловлены отличиями относительной растворимости и содержания белка в органике разных типов (Gelinas и Goulet 1983).

Анализы разведений в агаре и бульоне показали несовпадающие вещества, влияющие на антимикробную активность МЧД. Это несоответствие может объясняться различиями анализов по росту микроорганизмов и экспозиции антимикробным агентом (Rios с соавторами, 1988; Hili с соавторами, 1997). Присутствие дрожжей хотя достоверно и не влияло на результаты анализов разведений в агаре и в бульоне, эксперименты по Уайтмору-Минеру показали явное влияние дрожжей на антимикробную активность. Возможно, это следствие существенных методологических отличий, например, продолжительности экспозиции МЧД на микроорганизмы и температуры проведения анализов.

Методику Уайтмора-Минера можно усовершенствовать выполнением подсчета жизнеспособных микроорганизмов вместо сообщения результата как положительный или отрицательный рост. Это позволит повысить воспроизводимость, поскольку результаты «положительный рост»/«отрицательный рост» сильно искажаются ошибками выборки (Coates 1988; Bloomfield 1991; Miner с соавторами, 1997). Подсчет числа жизнеспособных микроорганизмов позволит рассчитывать логарифмический показатель снижения численности – параметр, широко применяемый для измерения антимикробной активности веществ (Coates 1988). Кроме того, методику можно дополнить несколькими (вместо одного) моментами времени, что позволит исследовать изменения антимикробной активности как функцию от времени.

Все влияющие на активность взаимодействия позволяют лучше понять механизм действия МЧД, о котором достаточно мало известно (Gustafson с соавторами 1998). Среди интересных гипотез можно выделить следующие: механизмы антимикробного действия разные для разных типов микроорганизмов; или, поскольку МЧД содержит более 100 компонентов, то

они могут действовать по-разному, и некоторые из них могут синергически воздействовать на микробные клетки. Проведенные ранее исследования показали разную степень активности определенных компонентов МЧД по отношению к микроорганизмам (Carson и Riley 1995). Поэтому могут оказаться полезными исследования очищенных компонентов. Другим интересным направлением является исследование каких-то других факторов или условий, способных влиять на антимикробную активность МЧД, например, pH и температуры. Также будет полезной идентификация веществ, нейтрализующих активность МЧД, поскольку во многих исследованиях антимикробной активности применяется один или несколько нейтрализаторов для остановки текущих эффектов антимикробных агентов и микробных клеток (Russell с соавторами 1992).

Также пока остаются малоизученными взаимодействия между местно применяемым МЧД и органическим дебрисом кожи, слизистых оболочек или ран. Вместе с тем, эти органические вещества могут влиять на клиническую эффективность МЧД или получаемых на его основе препаратов. На клиническую эффективность также может повлиять состав фармацевтического средства с МЧД. Не исключено, что кроме поверхностно-активных веществ другие наполнители фармацевтической формулы также способны ослаблять активность антимикробных компонентов (Allwood и Shaw 1987), в том числе и МЧД.

Итак, данная работа показала, что поверхностно-активные вещества ослабляют антимикробную активность МЧД, вероятнее всего, за счет мицеллярной солюбилизации. Органика также оказывала подобное влияние на активность, скорее всего при помощи не одного, а нескольких механизмов, в том числе и реакций между органикой и МЧД в сочетании со специфическими для данного микроорганизма факторами. Подобные взаимодействия способны влиять на клиническую эффективность МЧД и получаемых на его основе препаратов, поэтому требуют дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Эта работа была выполнена при поддержке компании Australian Bodycare Corporation Pty Ltd, Currumbin, шт. Новый Южный Уэльс, Австралия

и, частично, на средства гранта от Rural Industries Research и Development Corporation (UWA-24 A).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Allwood, M.C. and Shaw, R.J.S. (1987) Preservation of mixtures, suspensions and syrups. In *Preservatives in the Food, Pharmaceutical and Environmental Industries* ed. Board, R.G., Allwood, M.C. and Banks J.G. pp. 197-210. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Altman, P.M. (1989) Australian tea tree oil - a natural antiseptic. *Australian Journal of Biotechnology* 3, 247-248.
- Bean, H.S. (1967) Types and characteristics of disinfectants. *Journal of Applied Bacteriology* 30, 6-16.
- Bishop, C.D. (1995) Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research* 7, 641-644.
- Bloomfield, S.F. (1991) Methods for assessing antimicrobial activity. In *Mechanisms of Action of Chemical Biocides, Their Study and Exploitation* ed. Denyer, S.P. and Hugo, W.B. pp. 1-22. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Brophy, J.J., Davies, N.W., Southwell, I.A., Stiff, I.A. and Williams, L.R. (1989) Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 1330-1335.
- Carson, C.F. and Riley, T.V. (1993) Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology* 16, 49-55.
- Carson, C.F. and Riley, T.V. (1995) Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 264-269.
- Carson, C.F. and Riley, T.V. (1996) Working with and against tea tree oil - issues of synergy and antagonism. Abstract 8. In *Program and Abstracts of the 19th International Federation of the Societies of Cosmetic Chemists Congress*. Sydney, Australia: International Federation of the Societies of Cosmetic Chemists.
- Coates, D. (1988) Comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate disinfectants: neutralization by serum. *Journal of Hospital Infection* 11, 60-67.
- Gelinas, P. and Goulet, J. (1983) Neutralisation of the activity of eight disinfectants by organic matter. *Journal of Applied Bacteriology* 54, 243-247.
- Gorbach, S.L., Bartlett, J.G. and Blacklow, N.R. (1992) *Infectious Diseases*. Philadelphia, USA: W.B. Saunders, Company.
- Gorman, S.P. and Scott, E.M. (1980) A review. Antimicrobial activity, uses and mechanism of action of glutaraldehyde. *Journal of Applied Bacteriology* 48, 161-190.

- Graham, B.M. (1978) The development of Australian legislation for disinfectants. *Australian Journal of Hospital Pharmacy* 8, 149-155.
- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S. et al. (1998) Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26, 194-198.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (1996) Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *American Journal of Infection Control* 24, 186-189.
- Hili, P., Evans, C.S. and Veness, R.G. (1997) Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulfoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology* 24, 269-275.
- Humphery, E.M. (1930) A new Australian germicide. *Medical Journal of Australia* 1, 417-418.
- International Organisation for Standardization (1996) ISO 4730 Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (tea tree oil). Switzerland: International Organisation for Standardization.
- Knight, T.E. and Hausen, B.M. (1994) *Melaleuca* oil (tea tree oil) dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 30, 423-427.
- Marshall, A.J.H. and Piddock, L.J.V. (1994) Interaction of divalent cations, quinolones and bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 34, 465-483.
- Miner, N., Armstrong, M., Carr, C.D., Maida, B. and Schlotfeld, L. (1997) Modified quantitative Association of Official Analytical Chemists Sporicidal test for liquid chemical germicides. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3304-3307.
- Nenoff, P., Haustein, U.-F. and Brandt, W. (1996) Antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against pathogenic fungi in vitro. *Skin Pharmacology* 9, 388-394.
- Park, M.K., Myers, R.A.M. and Marzella, L. (1992) Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clinical Infectious Diseases* 14, 720-740.
- Penfold, A.R. and Morrison, F.R. (1937) Some notes on the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Australian Journal of Pharmacy* 18, 274-275.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A. and Ettayebi, M. (1993) Inhibition of antibacterial activity of essential oils by Tween 80 and ethanol in liquid medium. *Journal de Pharmacie de Belgique* 48, 352-356.
- Rios, J.L., Recio, M.C. and Villar, A. (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23, 127-149.
- Russell, A.D. and Chopra, I. (1990) *Understanding Antibacterial Action and Resistance*. West Sussex, UK: Ellis Horwood Ltd.
- Russell, A.D., Hugo, W.B. and Ayliffe, G.A.J. (1992) *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation*, 2nd edn. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.

Whitmore, E.J. and Miner, N.A. (1976) Analysis and optimization of a quantitative organic soil neutralisation test for disinfectants. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 59, 1344-1351.