

Механизм антимикробного действия эфирного масла *Melaleuca alternifolia* (масло чайного дерева)

S.D. Cox¹, C.M. Mann¹, J.L. Markham¹, H.C. Bell², J.E. Gustafson³, J.R. Warmington³ and S.G. Wyllie³.

¹ Центр биоструктурных и биомолекулярных исследований. Университет Западного Сиднея, Хоксбери, Новый Южный Уэльс,

² Австралийский научно-исследовательский институт масла чайного дерева. Лисмор. Новый Южный Уэльс,

³ Genetica Biotechnologies, Бентли, Западная Австралия

7236/5/99: получено 14 мая 1999 года; доработано 16 августа 1999 года и принято 16 августа 1999

S.D. COX, CM, MANN, J.L. MARKHAM, H.C. BELL, J.E. GUSTAFSON, J.R. WARMINGTON AND S.G. WYLLIE. 2000. Эфирное масло *Melaleuca alternifolia* (чайное дерево) обладает широким спектром антимикробной активности. Механизм его действия в отношении грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* AG 100, грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* NCTC 8325, а также дрожжевых грибов *Candida Albicans* исследовался с помощью нескольких методов. В данной статье сообщается, что воздействие на эти микроорганизмы масла чайного дерева в минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной/фунгицидной концентрации вызывает угнетение дыхания, а также увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны бактерий и плазматической мембраны дрожжей, подтвержденное поглощением йодида пропидия. У кишечной палочки и золотистого стафилококка масло чайного дерева также вызывало

потерю ионов калия. Также наблюдались различия восприимчивости тестируемых организмов к маслу чайного дерева: они интерпретируются с точки зрения изменения скорости проникновения монотерпенов через клеточную стенку и структуры клеточной мембраны. Способность масла чайного дерева нарушать проницаемость барьера структур клеточных мембран с сопутствующей утратой хемиосмотического контроля является наиболее вероятной причиной его бактерицидного/ фунгицидного действия при минимальных ингибирующих уровнях.

ВВЕДЕНИЕ

Эфирное масло *Melaleuca alternifolia*, известное как масло чайного дерева, имеет долгую историю применения в качестве местного антисептика (Markham 1999). В последнее время оно пользуется репутацией безопасного, естественного и эффективного антисептика. Это вызвало всплеск популярности этого масла и в настоящее время оно в качестве основного антимикробного вещества или естественного консерванта входит в состав многих фармацевтических и косметических продуктов наружного применения.

Химический состав масла чайного дерева хорошо изучен; оно содержит в основном циклические монотерпены (Brophy и др., 1989), из которых около 50% окисленных и около 50% углеводороды. Масло чайного дерева обладает широким спектром антимикробной активности (см. Markham 1999 г. для обзора), которая в основном обусловлена терпинен-4-олом (Southwell и др. 1993; Carson и Riley, 1995).

Как известно, множества разных эфирных масел обладают антимикробными свойствами и во многих случаях эта способность связана с наличием активных монотерпеновых компонентов (Knobloch и др. 1988; Beylier 1979; Morris и др. 1979). Некоторые исследования также показали, что монотерпены оказывают мембраноразрушающий эффект (обзор Sikkema и др., 1995). Изучение клеток кишечной палочки после контакта с маслом чайного дерева с помощью электронной микроскопии показало потерю клеточного электроплотного материала и коагуляцию цитоплазматических компонентов, хотя было очевидно, что эти эффекты вторичны и произошли уже после гибели клеток (Gustafson и др. 1998). Это масло также стимулирует

выведение ионов калия из клетки, а также угнетало дыхание во взвесах клеток кишечной палочки, что подтверждает его летальное действие путем цитоплазматического повреждения мембраны (Сох и др., 1998).

Ниже сообщаются результаты дальнейшего изучения антимикробной активности масла чайного дерева в отношении трех клинически важных микроорганизмов *E. coli*, *Staphylococcus aureus* и *Candida Albicans*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Масло чайного дерева

Во всех тестах применялось масло чайного дерева из партия 6081, предоставленное Main Camp, Ballina, Новый Южный Уэльс, Австралия.

Рост тестовых микроорганизмов

Использованные во всех анализах клетки два раза пересеивались в ISO-сенситест бульон (Oxoid, Basingstoke, Великобритания) при исследовании кишечной палочки штамма AG 100, дериват K-12 (George и Levi, 1983) или *Staph. aureus* NCTC 8325, и в бульон с экстрактом солода (Oxoid) при опытах с *C. Albicans* KEM H5 при 37 ° C.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) и минимальные бактерицидные / фунгицидные концентрации (МБК).

Определение МИК/МБК выполнялось согласно описанию проводили, как описано у Gustafson и др. (1998), со следующими исключениями. В экспериментах с *C. Albicans* вместо бульона с экстрактом солода (Oxoid) использовался ISO-сенситест бульон (Oxoid), из разведенной/анализируемой смеси был исключен Твин-80. Минимальная бактерицидная/фунгицидная концентрация определялись путем отбора проб по 100 мкл из каждой пробирки, в которых отсутствовал рост на нейтрализующем бульоне, содержащем 30 г/л триптон-соевого бульона (Oxoid), 30 г/л нейтрализованного гидролизата печени (Oxoid) и 10 г/л лецитина (Defiance

Milling Co., Acacia Ridge,, Квинсленд). После 10 мин инкубации при комнатной температуре в каждую пробирку добавлялось по 10 мл ISO-сенситест (или бульон с экстрактом солода в опытах с *S. Albicans*), и затем выполнялась инкубация при 37 ° С в течение 72 часов. Минимальная бактерицидная/фунгицидная концентрация определялась как минимальная концентрация масла чайного дерева, при которой отсутствовал рост микрофлоры.

Анализ жизнеспособности

Ночная культура инокулировалась на ISO-сенситест бульон (бульона с экстрактом солода, используемый в экспериментах с *S. Albicans*). Культура выращивалась при 37 °С до экспоненциальной фазы (4-5 ч), один раз промывалась и ресуспендировалась в стерильные 100-мл конические колбы, содержащие по 20 мл суспензии клеток и заданный объем масла чайного дерева. Содержимое каждой колбы постоянно перемешивалось магнитной мешалкой для равномерного распределения масла по всему объему. Через заданные промежутки времени отбирались аликвоты (1 мл) в 9 мл нейтрализующего бульона и выдерживались при комнатной температуре 10 минут. Выполнялись 10-кратные последовательные разведения нейтрализующего бульона в 0,1% пептона, которые разливались в подготовленные чашки с триптон-соевым агаром (Oxoid). Колонии подсчитывались после 3-х дневной инкубации при 37 ° С и количество жизнеспособных клеток сообщалось как число колониеобразующих единиц (КОЕ) на мл.

Измерение дыхания

Уровень микробного дыхания определялся с помощью кислородного электрода, согласно описанию Cox и др. (1998). В экспериментах с *E. coli* и *S. Albicans* клеточные суспензии предварительно инкубировались в течение 5 минут при заданной концентрации масла чайного дерева, и затем измерялась дыхательная активность. В опытах с *Staph. aureus*, клетки в течение 10 минут предварительно инкубировались в присутствии масла чайного дерева, и затем выполнялись измерения.

Отток ионов калия

Концентрация ионов калия в суспензиях клеток измерялась с помощью калиевого селективного электрода согласно описанию Cox и др. (1998). Общая концентрация свободного калия в суспензии *Staph. aureus* определялась после инкубации в лизостафине (100 мкг/мл) при 37° С в течение 60 минут с последующей обработкой ультразвуком. Для измерения суммарного свободного калия в *S. Albicans*, клетки лизировались инкубацией в хитиназе (1 мг/мл) и литиказе (1 мг/мл) при 37° С в течение 60 минут, а затем обрабатывались ультразвуком. Полнота лизиса в каждом случае подтверждалась микроскопическим исследованием.

Поглощение йодида пропидия

Клетки (100 мл культуры) выращивались в течение ночи согласно описанию выше, промывались и ресуспендировались в 50 ммоль/л натрий-фосфатном буфере, рН 7,1. Аликвоты (1 мл) помещались в конические колбы, содержащие 19 мл буфера и заданное количество масла чайного дерева. Плотность инокуляции составляла примерно 10^8 КОЕ/мл. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре, аликвоты по 50 мкл переносились в пробирки Эппендорфа, содержащие 950 мкл фосфатного буфера в пробирках FACS (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, Mountain View, Калифорния). Эти пробирки хранились на льду, и в них добавлялось по 5 мкл окрашивающего раствора, состоящего из 2-5 мг/мл йодида пропидия (Molecular Probes, Eugene, штат Орегон), растворенного в очищенной воде milliQ, до достижения конечной концентрации йодида пропидия 10 мкг/мл. Сразу же после этого определялась процентная доля клеток, окрашенных йодидом пропидия, с помощью FAC-Scan проточного цитометра (Becton Dickinson).

Анализ выведения карбоксифлуоресцеина под влиянием масла чайного дерева

По процедуре New (1990) готовились многослойные липидные везикулы. Фосфолипиды (14 мг фосфатидилэтаноламина, 4 мг фосфатидилглицерина и 2 мг кардиолипина) растворяли в хлороформе в

круглодонной колбе на 100 мл и выпаривали досуха. После этого сухую смесь фосфолипидов ресуспендировали в 2 мл 50 ммоль/л натрий-фосфатного буфера, рН 7,0, содержащего самогасящуюся концентрацию карбоксифлуоресцеин (100 ммоль/л), с легким встряхиванием со стеклянными шариками. Полученную суспензию липосом (многослойных липидных везикул) затем диализовали на протяжении ночи для удаления неинкапсулированного карбоксифлуоресцеина. Суспензию липосом (100 мкл) вливали в пробирку Эппендорфа, и затем добавляли фосфатный буфер и заданное количество масла чайного дерева до достижения конечного объема 1 мл. После этого смесь перемешивали вихревой мешалкой и инкубировали на протяжении заданного интервала времени с периодическим перемешиванием каждые 5 минут. По окончании инкубационного периода 50 мкл липосомной суспензии отбирали в 2 мл фосфатного буфера. Флуоресценцию измеряли в стеклянной кювете флуоресцентным спектрофотометром (Hitachi F-4500, Hitachi, Сан-Хосе, Калифорния, США, $\lambda_{ex} = 470$ нм; $\lambda_{em} = 520$ нм). Стопроцентная утечка карбоксифлуоресцеина определялась путем добавления тритона X-100 1,0об.%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) и минимальные бактерицидные/фунгицидные концентрации (МБК) масла чайного дерева

Для кишечной палочки штамма AG 100 и *Staph. aureus* NCTC 8325 значения МИК и МБК масла чайного дерева составляли соответственно 0,25об.% и 0,5об.%. Значения МИК и МБК для *S. Albicans* KEM 115 были в два раза ниже – соответственно, 0,125об.% и 0,25об.%.

Влияние масла чайного дерева на жизнеспособность клеток

Влияние масла чайного дерева на жизнеспособность кишечной палочки, золотистого стафилококка и *S. Albicans* показано на рис. 1 (а, б, в). Каждый график отображает результаты трех отдельных экспериментов, показавших сходные результаты. К минимальной ингибирующей и

минимальной бактерицидной концентрации масла чайного дерева наиболее чувствительной оказалась кишечная палочка, затем *S. Albicans* и, наконец, золотистый стафилококк.

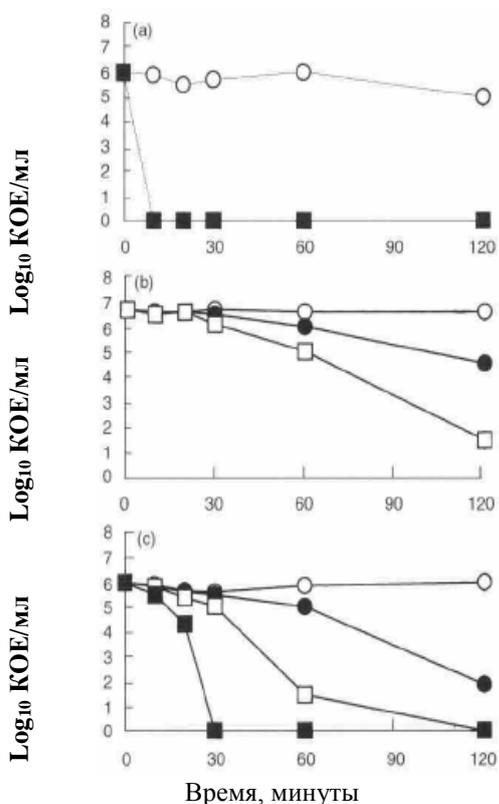


Рис. 1. Влияние масла чайного дерева на жизнеспособность тестовых микроорганизмов:

- (a) кишечная палочка AG 100: (○) без масла чайного дерева; (■) 0,50 об.% масла чайного дерева.
- (b) золотистый стафилококк NCTC 100: (○) без масла чайного дерева; (●) 0,25% об% масла чайного дерева; (■) 0,50 об.% масла чайного дерева.
- (c) *S. Albicans* KEM H6:100: (○) без масла чайного дерева; (●) 0,125 об.% масла чайного дерева; (□) 0,25 об.% масла чайного дерева; (■) 0,50 об.% масла чайного дерева.

Влияние масла чайного дерева на дыхание

Масло чайного дерева угнетало дыхание в суспензии клеток кишечной палочки, золотистого стафилококка и *S. Albicans* (рис. 2). Угнетение дыхания *E. coli* начиналось при 0,25 об.% масла чайного дерева и дыхание полностью останавливалось при 0,5об.%. Дыхание клеток *S. Albicans* угнеталось при 0,125об.%, которая являлась минимальной анализируемой концентрацией,

соответствующей МИК этого микроорганизма. Ингибирование клеточного дыхания *Staph. aureus* (после 10 минут воздействия масла чайного дерева), начиналось при концентрации 0,5об.%.

Влияние масла чайного дерева на целостность мембраны

После 30-минутной экспозиции 0,25 об.% масла чайного дерева клеточных суспензий кишечной палочки, золотистого стафилококка и *S. Albicans* имело место увеличение клеточной проницаемости для йодида пропидия и флуоресцентно-окрашенной нуклеиновой кислоты (рис. 3), по сравнению с контрольной взвесью без масла чайного дерева. Отсутствие проникновения йодида пропидия через интактную цитоплазматическую или плазматическую мембрану (см. Brul и др. 1997; Mason и др. 1997; Wenisch и др. 1997; Lebaron и др.1998) подтверждалась низким уровнем поглощения, наблюдавшимся в клетках, не подвергавшихся воздействию масла чайного дерева (рис. 3).

Масло чайного дерева в концентрации 0,25 об.% вызывало выведение ионов калия из клеток кишечной палочки и золотистого стафилококка (рис. 4). Данные трех отдельных, показавших сходные результаты, экспериментов свидетельствуют, что утечка из клеток *E.coli* начиналась сразу же после добавления масла чайного дерева и примерно через 30 мин достигала 100% суммарного запаса клеточного калия. Выведение ионов калия из клеток золотистого стафилококка начиналось примерно через 5 минут воздействия масла чайного дерева и продолжалось более медленными темпами, достигая после 30 мин 20%. Утечка ионов калия из клеток *S. Albicans* в присутствии 0,25об.% масла чайного дерева в течение двух часов не превышала фонового уровня (данные не представлены). Тем не менее, после 60-минутного контакта с 2,5 об.% масла чайного дерева количество калия в надосадочных жидкостях клеток составляло 23,1% от такового в надосадочных жидкостях общих клеточных лизатов.

Масло чайного дерева (0,25 об.%) также стимулировало выведение инкапсулированного карбоксифлуоресцеина из суспензии многослойных липидных везикул (рис. 5).

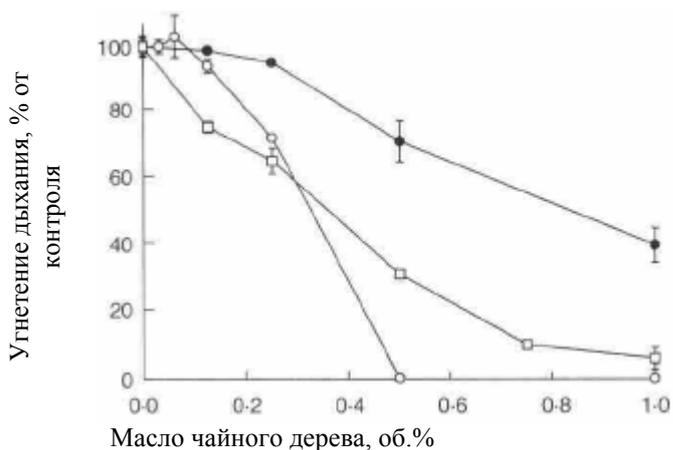


Рис. 2 Воздействие концентрации масла чайного дерева на скорость потребления O_2 в суспензии клеток кишечной палочки AG 100 (O), золотистого стафилококка NCTC 8325 (●) и *C. Albicans* KEM H5 (□). Величина ошибки представлена стандартными отклонениями ($n = 3$) по данным двух экспериментов. В некоторых случаях величина погрешности была столь малой, что отображающий ее столбик перекрывался символом данных.

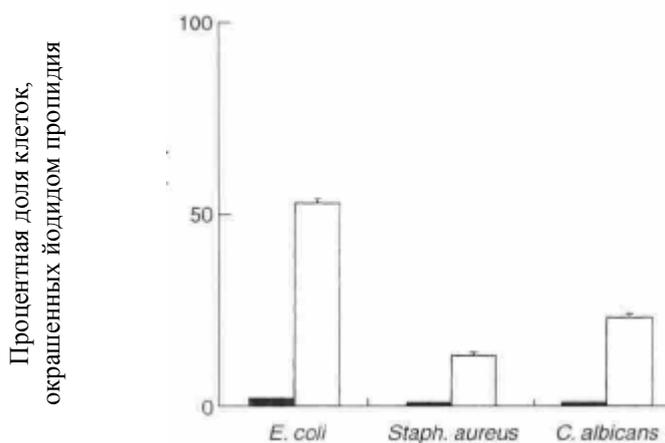


Рис. 3 Поглощение йодида пропилда в суспензии клеток кишечной палочки AG100, золотистого стафилококка NCTC 8325 и *C. Albicans* KEM H5. Клетки подвергались воздействию 0,25об.% масла чайного дерева в течение 30 мин (□) и сравнивались с контрольной колбой без масла чайного дерева (■). Величина ошибки представлена стандартными отклонениями, рассчитанными по данным отдельных анализов ($n = 3$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В этом исследовании масло чайного дерева в минимальной ингибирующей концентрации угнетало дыхание клеток кишечной палочки, золотистого стафилококка и *C. Albicans*. Не исключено, что масло чайного дерева напрямую ингибирует дыхательные ферменты или обменные процессы. Вместе с тем, полученные результаты показывают, что

минимальные ингибирующие уровни масла чайного дерева также изменяют структуру клеточной мембраны. Наблюдалось повышенное поглощение нуклеиновой кислоты, окрашенной йодидом пропидия, для которого клеточные мембраны, как правило, непроницаемы. Кроме того, происходила утечка ионов калия, которая в суспензии клеток *E.coli* начиналась сразу же после добавления масла чайного дерева, а в суспензии клеток золотистого стафилококка в течение 5 минут.

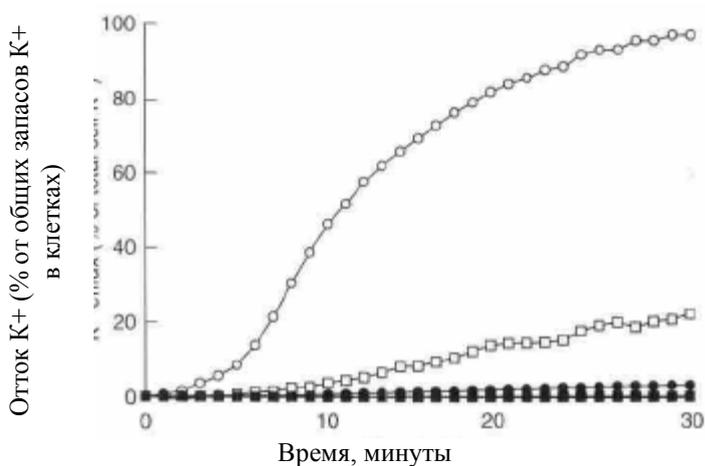


Рис. 4 Действие 0,25 об.% масла чайного дерева на отток ионов калия в клеточных суспензиях кишечной палочки AG 100 и золотистого стафилококка NCTC 8325. (O): *E. coli* 0,50% об% масла чайного дерева, (●): *E. coli*, без масла чайного дерева. (□): *Staph. aureus*, 0,25% об% масла чайного дерева, (■): *Staph. aureus* без масла чайного дерева.

В экспериментах с *C. Albicans* не было обнаружено появления ионов калия в надосадочной жидкости клеток, содержащих 0,25 об.% масла чайного дерева. Тем не менее, окрашивание клеток *C. Albicans* йодидом пропидия после добавления масла чайного дерева является явным признаком повреждения плазматической мембраны. Возможно, что ионы калия не появляются в надосадочной жидкости (после воздействия на протяжении до 2 ч) потому, что они по-прежнему остаются заключенными в толстом слое клеточной стенки *Candida Albicans*. Учитывая повышенную проницаемость для йодида пропидия, представляется маловероятным, чтобы плазматическая мембрана оставалась непроницаемой для ионов калия. Дополнительным подтверждением общей токсичности масла чайного дерева в отношении мембранных структур является его влияние на проницаемость многослойных липосом.

Ранее мы показали, что масло чайного дерева в минимальной ингибирующей концентрации угнетает дыхание и вызывает утечку клеточного калия в клетках *E.coli* (Сох и др., 1998). Эти явления, а также выводы, представленные здесь, показывают, что масло чайного дерева повреждает структуру клеточных мембран кишечной палочки, золотистого стафилококка и *S. Albicans*. Цитоплазматические мембраны бактерий, плазматическая и митохондриальная мембраны дрожжей обеспечивают барьер для малых ионов, в частности H^+ , K^+ , Na^+ и Ca^{2+} и позволяют клеткам и органеллам контролировать поступление и отток из клеток различных соединений. Эта роль барьера проницаемости клеточных мембран является неотъемлемой частью многих клеточных функций, в частности сохранение энергетического состояния клетки, других мембраносвязанных процессов энергообмена, транспорта солей, регуляции обмена веществ и регулирования давления тургора (Booth 1985; Poolman и др. 1987; Trumpower и Gennis 1994).

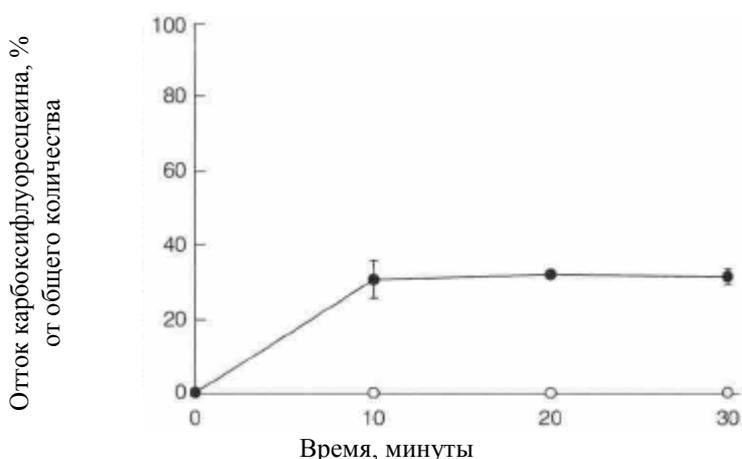


Рис. 5 Утечка карбоксифлуоресцеина из многослойных липидных везикул под влиянием масла чайного дерева. (O): без масла чайного дерева; (●): 0,25об.% масла чайного дерева. Величина ошибки представлена стандартными отклонениями ($n = 2$).

Антимикробное действие эфирных масел и их монотерпеноидных компонентов обычно объясняют токсическим действием на мембранные структуры и функции (Andrews и др. 1980; Uribe и др. 1985; Knobloch и др. 1988). Sikkema и др. (1994) показали, что циклические монотерпены за счет присущих им липофильных характеристик частично переходят из водной

фазы в мембранные структуры. В результате происходит расширение мембран, увеличение проницаемости мембран и ингибирование мембранных ферментов. В клетках дрожжей и изолированных митохондриях, α - и β -пинены повреждают целостность клеток, угнетают дыхание и тормозят процессы переноса ионов, а также повышают проницаемость мембран (Andrews и др. 1980; Uribe и др. 1985). Недавно, Helander и др. (1998) описали влияние различных эфирных компонентов на проницаемость внешней мембраны грам-отрицательных бактерий. Тот факт, что вызванное маслом чайного дерева повреждение клеточной структуры мембран сопровождалось снижением жизнеспособности всех трех исследуемых микроорганизмов, заставляет предположить описанное Helander явление, как наиболее вероятную причину гибели клеток.

Несмотря на сходные значения МИК/МБК, исследуемые здесь микроорганизмы продемонстрировали явные отличия восприимчивости к маслу чайного дерева. Темпы снижения жизнеспособности *S. Albicans* в 0,25об.% масла чайного дерева были меньше, чем у кишечной палочки при воздействии той же концентрации; скорость инактивации золотистого стафилококка была медленнее, чем у кишечной палочки или *S. Albicans*. Относительное подавление дыхания и степень повреждения мембран этих микроорганизмов демонстрировали аналогичные тенденции. Учитывая широкий спектр антимикробной активности масла чайного дерева и общий мембрано-повреждающий эффект, вполне вероятно, что наблюдаемые отличия отражают скорость проникновения активных компонентов масла через клеточную стенку и в фосфолипидные участки клеточных мембранных структур.

Подведем итог: наши наблюдения подтвердили, что антимикробная активность масла чайного дерева объясняется его способностью нарушать проницаемость барьера мембранных структур микроорганизмов. Этот механизм действия одинаков в отношении клеток кишечной палочки, золотистого стафилококка и *S. Albicans*, и сходен с другими мембрано-активными дезинфицирующими средствами и консервантами широкого спектра действия, например, производными фенола, хлоргексидина (см. McDonnell и Russell 1999) и парабензойной кислоты (Sox 1997).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Эта работа полностью профинансирована исследовательским институтом масла австралийского чайного дерева (ATTORI), Лисмор, Новый Южный Уэльс, Австралия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andrews, R.E., Parks, L.W. and Spence, K.D. (1980) Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 301-30A
- Beylier, M. (1979) Bacteriostatic activity of some Australian essential oils. *Perfumer and Flavorist* 4, 23-25.
- Booth, L.R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria *Microbiological Reviews* 49, 359-378.
- Brophy, J.J., Davies, N.W., Southwell, L.A., Stiff, L.A. and Williams, L.R. (1988) Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-yl* type (Australian tea tree) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 1330-1335.
- Brul, S., Nussbaum, J. and Diehlmann, S.K. (1997) Fluorescent probes for wall porosity and membrane integrity in filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* 28, 169-178.
- Carson, C.F. and Riley, T.V. (1995) Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Botany* 78, 264-269.
- Cox, S.D., Gusarofson, J.K., Mann, C.M., Markham, J.L., Liew, Y.C., Harland, R.P., Bell, H.C., Warmington, J.R. and Wyllie, S.G. (1998) Tea tree oil causes K4 leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26, 355-358.
- George, A.M. and Levy, S.B. (1983) Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline, *Journal of Bacteriology* 155, 531-540.
- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G. and Warmington, J.R. (1998) Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26, 194-198.
- Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Kyosti, L.-K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, K.J., Gorris, G.M. and von Vrhiggi, A. (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46, 3590-3595.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Wets, N. and Weigand, H. (1988) Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oils Research* 1, 119-128.
- Lebaron, P., Catala, P. and Parthuisot, N. (1998) Effectiveness of SYTOX Green stain for bacterial viability assessment. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2697-2700.
- Markham, J. L. (1999) Biological activity of tea tree oil. In *Tea Tree, the Genus Melaleuca*, ed. Southwell, I. and Lowe, R., pp. 169-190. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.

- Mason, D.J., Dybowski, R., Earriek, J.W. and Gant, V.A. (1997) Antimicrobial action of rabbit leukocyte CAI'181(1, n7. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 624-629
- McDonnell, G. and Russell, A.D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 147-179.
- Morris, J.A., Khettry, A. and Scitz, E.W. (1979) Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *Journal of the American Chemical Society* 56, 595-603.
- New, R.R.C. (1990) Characterization of liposomes. In *Liposomes; A Practical Approach*, cd. New, R.C.C., pp. 105-162. Oxford: IRI. Press.
- Poolman, B., Driessen, A.J.M. and Konings, W.N. (1987) Regulation of solute transport in Streptococci by external and internal pH values. *Microbiological Reviews* 51, 498-508.
- Sikkema, J., de Bunt, J. A.M. and Poolman, B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269, 8022-8028.
- Sikkema, J., de Bunt, J.A.M. and Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59, 201-222.
- Southwell, I.A., Hayes, A.J., Markham, J.I., and Leach, D.N. (1993) The search for optimally bioactive Australian tea tree oil. *Acta Horticulturac* 334, 265-275.
- Sox, T.E. (1997) Mechanisms of action of cosmetic preservatives. In *Cosmetic Microbiology: a Practical Handbook*, ed. Brannan, D.K. pp. 163-176, Boca Raton, FL: CRC Press.
- Trumpower, B.E. and Gennis, R.B. (1994) Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annual Reviews in Biochemistry* 63, 675-716.
- Uribe, S., Ramirez, T. and Pena, A. (1985) Effects of α -pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology* 161, 1195-1200.
- Wenisch, C, Linnau, K.F., Parschalk, B., Zedtwitz-Lebenstein, K. and Georgopoulou, A. (1997) Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 5-10.