

# 茶树油对 3 种痤疮致病菌的抑制作用研究

胡忆雪<sup>1</sup>, 姚 雷<sup>1</sup>, 黄 健<sup>2</sup>, 吴亚妮<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海爱普香料集团股份有限公司, 上海 200072)

**摘 要:** 探讨茶树油在缓解痤疮方面的功效, 为茶树油在抑菌方面的推广应用提供依据。采用茶树油对 3 种痤疮致病菌(痤疮丙酸杆菌 S21016 菌株、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌)进行定性、定量的抗菌性研究。定性试验中, 采用贴片法测定茶树油对 3 种痤疮致病菌的抑菌圈大小; 定量试验中, 采用试管培养法测定茶树油对 3 种菌的最低抑菌浓度(MIC)。试验结果表明: 茶树油对 3 种痤疮致病菌均具有良好的抑菌作用, 对痤疮丙酸杆菌 S21016 菌株的 MIC 值为  $0.20 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 对金黄色葡萄球菌的 MIC 值为  $0.15 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 对表皮葡萄球菌的 MIC 值为  $0.15 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**关键词:** 茶树油; 痤疮致病菌; 抗菌性

**中图分类号:** R 282.71

**文献标识码:** A

## Antimicrobial Activity of Tea Tree Oil Against Acne Bacterias

HU Yi-xue<sup>1</sup>, YAO Lei<sup>1</sup>, HUANG Jian<sup>2</sup>, WU Ya-ni<sup>1</sup>

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

2. Apple Flavor & Fragrance Group Co. Ltd., Shanghai 200072, China)

**Abstract:** To investigate the efficiency of tea tree oil on acne, both qualitative and quantitative antimicrobial activity of tea tree oil against three kinds of acne bacterias (*Propionibacterium acnes* S21016, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) were evaluated. The tea tree oil had antimicrobial activity for all of the three kinds of acne bacterias. The MIC values of tea tree oil towards *Propionibacterium acnes* S21016, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* were 0.20, 0.15 and  $0.20 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  respectively.

**Key words:** tea tree oil; acne bacteria; antimicrobial activity

茶树油(Tea tree oil, TTO)取自于桃金娘科(Myrtaceae)白千层属(*Melaleuca* L.)的数种植物, 其中最主要的一种为互叶白千层(*Melaleuca alternifolia*), 故又称为互叶白千层油, “茶树油”是其商业名称。互叶白千层原产于澳大利亚, 故该精油又称为澳洲茶树油, 我国于 1993 年在广西、广东省部分地区开始对白千层进行引种试验, 十几年来

无论在种植方面还是在精油提取加工方面都取得了成功。互叶白千层植物的新鲜枝叶经水蒸气蒸馏, 即可得到无色至淡黄色的精油。该精油具有良好的广谱杀菌保健以及防虫驱蚊作用, 是天然抗菌剂, 无论在体内、体外对真菌和细菌都有较强的抑制作用, 据研究<sup>[1-3]</sup>, 茶树油中含有多种活性成分, 如 4-松油醇有极强的抗菌作用, 对枯草杆菌、金黄色葡萄球

收稿日期: 2010-12-06

基金项目: 上海交大 PRP 项目(T15012009)

作者简介: 胡忆雪(1987-), 女, 硕士生, 研究方向: 芳香植物精油功效研究, E-mail: yxhu@sjtu.edu.cn;

吴亚妮为本文通讯作者, E-mail: ynwu@sjtu.edu.cn

菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、白色念珠菌<sup>[4]</sup>等均具有较强的抗菌作用。茶树油由于其所含的多种活性成分而被广泛应用于各种领域,且茶树油性温和,可直接用于皮肤表面,故尤为常见于各种皮肤外用制剂以及化妆品的制备。

寻常痤疮(又名暗疮、粉刺)是一种常见的慢性毛囊、皮脂腺炎症性皮肤病,其病因除与内分泌、免疫、皮脂腺分泌过多和毛囊角化过度等因素有关外,还与痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌的混合感染密切相关。痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*),也称痤疮杆菌、疮疱丙酸杆菌,革兰氏阳性厌氧杆菌,是一种细胞内寄生菌,属于皮肤的正常菌群,一般寄生在皮肤的毛囊及皮脂腺中,它可以分泌蛋白质、酶、脂多糖等成分,为条件致病菌,引起的感染均为内源性感染<sup>[5-6]</sup>,是造成青春痘的主要细菌。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是人类化脓感染中最常见的病原菌,可引起局部化脓感染,能够在痤疮病灶上加重感染发炎,导致痤疮更严重,曾有研究证实<sup>[7]</sup>,当金黄色葡萄球菌感染得到控制时,痤疮明显好转。表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)是人体皮肤和黏膜上定居的正常菌群之一,从痤疮病患分离其致病菌,发现痤疮病损中葡萄球菌的检出率与痤疮丙酸杆菌接近,且应用葡萄球菌菌苗治疗痤疮收到了良好的效果<sup>[8]</sup>,说明葡萄球菌与痤疮发病有密切的关系。

国内已有颇多研究证实茶树油有抗菌方面的功效,但多集中于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌以及白色念珠菌方面,而本研究则主要针对于茶树油对痤疮丙酸杆菌的抑制功效,并辅以金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌为供试菌种,使用广西万家辉公司生产的茶树油进行抑菌试验,以验证茶树油在缓解痤疮方面的作用,为国产茶油抑菌功效提供数据支持,也为国产茶油的推广应用提供依据。

# 1 材料和方法

## 1.1 试验材料

### 1.1.1 精油材料

广东产茶树精油,由广西万家辉公司提供。

用 GC-MS 对实验用茶树油进行分析,得到主要成分与茶树油 ISO4730 国际标准对照(见表 1),发现茶树精油中主要成分含量均符合国际标准,证明了实验用油的品质。

表 1 实验所用茶树油主要成分与 ISO4730 国际标准对照表  
Tab. 1 Main components of tested tea tree oil compared with the ISO4730 standards

样品英文名	中文名	样品成分含量/%	ISO4730 范围/%
$\alpha$ -pinene	$\alpha$ -蒎烯	2.62	1~6
$\alpha$ -terpinene	$\alpha$ -松油烯	10.03	5~13
Lim onene	柠檬烯	3.69	0.5~4.0
p-cym ene	对伞花烃	1.77	0.5~12.0
1,8-cineole	1,8-桉叶素	3.96	0~15
$\gamma$ -Terpinene	$\gamma$ -松油烯	21.66	10~28
Terpinolene	异松油烯	3.84	1.5~5.0
4-terpineol	4-松油醇	42.01	>30

### 1.1.2 对比药物

过氧苯甲酰凝胶,法国高德美国际公司;克座隐酮乳膏,黑龙江天龙药业有限公司。

### 1.1.3 供试菌种

痤疮丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes*, G<sup>+</sup>;金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, G<sup>+</sup>;表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis*, G<sup>+</sup>。

痤疮丙酸杆菌由复旦大学微生物实验室提供,金葡菌、表葡菌均由上海交通大学微生物实验室提供。

### 1.1.4 培养基

液体硫乙醇酸盐培养基用于痤疮丙酸杆菌的培养,营养琼脂、营养肉汤用于金葡菌、表葡菌的培养。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 菌悬液的制备

将各菌种于相应的液体培养基中进行活化,金黄色葡萄球菌菌种和表皮葡萄球菌菌种转移到营养肉汤液体培养基中进行培养,痤疮丙酸杆菌菌种转移到硫乙醇酸盐培养基中进行无氧培养。然后利用平板计数法将各菌液的浓度稀释至 10<sup>5</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>备用。

### 1.2.2 抑菌圈试验

将直径 6 mm 的灭菌滤纸片贴于均匀涂布菌液的平板上,向滤纸片上滴加茶树油,共设置 3 个用量梯度(4、6、8  $\mu$ L),每梯度 3 个重复,结果取其平均值。设置药物对照,用无水乙醇将对比药物分别稀释至 0.2 g · mL<sup>-1</sup>(由于药物均为膏状体,故用无水乙醇稀释,0.2 g · mL<sup>-1</sup>是其饱和浓度)待测。将培养皿放于培养箱中进行培养,金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌 37 °C 有氧培养,24 h 后观察结果;痤疮丙酸杆菌 37 °C 无氧培养,24 h 后观察结果。抑菌

圈实验判定标准: 抑菌圈的直径大于 20 mm, 极敏; 15~20 mm 高敏; 10~15 mm 中敏; 7~9 mm 低敏, 小于 7 mm 不敏感。

1.2.3 最低抑菌浓度 (minimum inhibition concentration, MIC) 试验

在各试管中加入 9 mL 液体培养基, 1 mL 供试菌液( $10^5$  cfu · mL<sup>-1</sup>)待用。为了使脂溶性的精油和乳膏药物更均匀地在培养基中分布, 选用无水乙醇作为调配介质, 调配 TTO 与脂溶性对比药物。按照设定的实验浓度( $\mu$ L · mL<sup>-1</sup>), 取相对量的 TTO 及对比药物分别于各个试管中, TTO 共设 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40  $\mu$ L · mL<sup>-1</sup> 7 个浓度梯度, 每梯度设 3 个重复和 1 个菌液空白对照。金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌 37 ℃, 摇床培养 24 h 后观察结果; 痤疮丙酸杆菌 37 ℃, 无氧培养 24 h 后观察结果。肉眼观察培养后培养基的浑浊度, 并取各培养基 10  $\mu$ L, 进行平板涂布, 进行培养后, 观察菌落生成情况。若培养基保持清澈透明且平板涂布培养未有菌落生成的, 则确定为最低抑菌浓度 MIC。

1.2.4 抑菌生长曲线

基于上一实验得到的 TTO 与对比药物的 MIC 测定抑菌生长曲线。实验设 3 组: A 组为对照组, 取

3 个锥形瓶, 分别加入 90 mL 液体培养基和 10 mL 供试菌液( $10^5$  cfu · mL<sup>-1</sup>)。B 组为药剂对照组, 取 3 个锥形瓶, 分别加入 100 mL 液体培养基和相对于 3 种菌种的 MIC 的 TTO 或对比药物。此对照组用于消除 TTO 和对比药物可能带来的浊度误差。C 组为供试组, 取 3 个锥形瓶, 同时加入 90 mL 液体培养基、10 mL 供试菌液( $10^5$  cfu · mL<sup>-1</sup>)以及相对于 3 种菌种的 MIC 的 TTO 或对比药物。金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌置于 37 ℃摇床培养, 痤疮丙酸杆菌 S21016 变种置于 37 ℃无氧培养箱培养, 每隔 2 h, 测得  $A_{560nm}$  值。通过记录的  $A_{560nm}$  值变化, 进行分析, 并得出抑菌生长曲线。

2 结 果

2.1 TTO 和对比药物对 3 种痤疮致病菌的抑菌圈结果

TTO 的定性抗菌试验结果见表 2。从表 2 数据可知, TTO 对 3 种菌株均具有良好的抗性, 且随着精油用量的增加, 抑制效果也愈明显。过氧苯甲酰和克痤隐酮的抗菌效果均不及 TTO, 说明所选 TTO 达到了良好的抑菌效果。此外, 在对 3 种菌株的空白对照和酒精对照试验中, 均未检测到抑菌圈。

表 2 TTO 和对比药物对 3 种痤疮致病菌的抑菌圈结果

Tab. 2 Effect of TTO and positive control drugs on growth of the three acne microbes

	用量/ $\mu$ L	抑菌圈大小/mm					
		金黄色葡萄球菌		表皮葡萄球菌		<i>P. acnes</i> S21016	
TTO	4	11.7	++	9.8	+	16.7	++++
	6	19.1	++++	11.2	++	20.7	+++++
	8	22.3	+++++	13.7	++	25	+++++
过氧苯甲酰	4	6.8	—	11	++	9	+
	6	9.2	+	12.3	++	9.3	+
	8	10	+	13.3	++	10	++
克痤隐酮	4	9	+	6.7	—	7	+
	6	12.3	++	10	+	8	+
	8	14.7	++	10.3	++	13.7	++

注: “—”表示不敏感, 抑菌圈直径< 7 mm; “+”表示低敏, 抑菌圈直径 7~10 mm;  
“++”表示中敏, 抑菌圈直径 10~15 mm; “+++”表示高敏, 抑菌圈直径 15~20 mm;  
“++++”表示极敏, 抑菌圈直径> 20 mm。

2.2 TTO 和对比药物对 3 种痤疮致病菌最低抑菌浓度(MIC)测定结果

TTO 对 3 种痤疮致病菌的 MIC 值(见表 3)表明, TTO 对金黄色葡萄球菌的抑制能力最强, 当精油浓度为 0.15  $\mu$ L · mL<sup>-1</sup> 时, 试管中已没有菌落被

检测出来, 而对表皮葡萄球菌和 *P. acnes* S21016 的 MIC 值均为 0.2  $\mu$ L · mL<sup>-1</sup>。为了使 TTO 能够更均匀地在培养基中分布, 选用无水乙醇作为助溶剂, 考虑到乙醇本身有一定杀菌作用, 故设置了乙醇对照试验, 结果表明在本试验设定的浓度下, 乙醇对供

试菌种没有明显抑制作用, 据此我们认为, 本实验中, 选用乙醇作为助溶剂, 对 TTO 的最低抑菌浓度的测定均无影响。

从表 4 数据可知, 过氧苯甲酰和克痤隐酮这 2 种药物对 *P. acnes* S21016 菌株的抑制作用最强, 其最低抑菌浓度 MIC 最小。但过氧苯甲酰对金黄色葡萄球菌的抑制力并不强, 却对表皮葡萄球菌和 *P. acnes* S21016 的抑制力保持一个稳定的浓度 ( $0.1\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。克痤隐酮对表皮葡萄球菌的抑制力较弱, 对于其他种类的菌株则效果平均, 相对而言, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用稍强一些。

表 3 TTO 对 3 种痤疮致病菌的 MIC 值

Tab. 3 Minimum inhibitory concentration (MIC) of TTO against three acne microbes

菌种	茶树精油浓度/ $(\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1})$					
	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.40
金黄色葡萄球菌	+	/	/	/	/	/
表皮葡萄球菌	++	+	/	/	/	/
<i>P. acnes</i> S21016	++	+	/	/	/	/

注: / 表示无菌生长, + 少量菌落生长, ++ 表示较多菌落生长但可计数, +++ 表示菌落无法计数。

表 4 对照药物对 3 种痤疮致病菌的 MIC 值( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

Tab. 4 Minimum inhibitory concentration (MIC) of the positive control drugs against three acne microbes

	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌	<i>P. acnes</i> S21016
过氧苯甲酰	$> 0.2$	0.1	$< 0.01$
克痤隐酮	0.1	$> 0.2$	$< 0.01$

2.3 抑菌生长曲线

本实验所用茶树精油在对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、*P. acnes* S21016 的浓度分别为其最低抑菌浓度 MIC:  $0.15$ 、 $0.2$ 、 $0.2\text{ }\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 克痤隐酮乳膏、过氧苯甲酰凝胶的浓度均为  $0.1\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

从图 1 的数据中可得知, 未添加 TTO 和对比药物时, 培养 6 h 后, 金黄色葡萄球菌就进入对数生长期, 大量繁殖。茶树精油的抑制效果可持续 14 h, 在随后的 6 h 内菌液生长略有上升周折, 但后 2 h 后仍将菌液浓度控制在了小范围之内。而克痤隐酮乳膏的抑菌效果则不明显, 在 10~12 h 内, 可略微抑制金黄色葡萄球菌进入对数期, 但对菌种的持续抑制效果则不如茶树精油。对比图 1 中对比药物克痤隐酮乳膏与 TTO 最低抑菌浓度下的细菌生长曲线可得, TTO 的抑菌效果比阳性对照更加明显和高效。

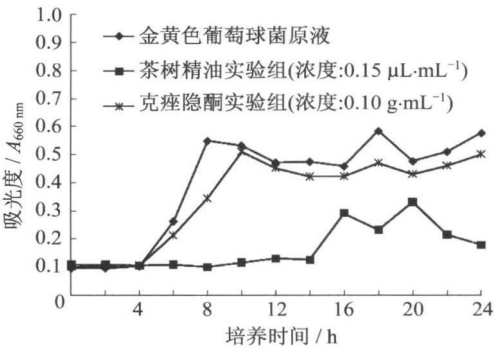


图 1 茶树精油对金黄色葡萄球菌的抑制生长曲线  
Fig. 1 Growth of *Staphylococcus aureus* with the TTO

从图 2 的数据中可得知, TTO 的抑制效果可持续 10 h, 在随后的几小时内菌液生长呈现上下的波动, 但后 6 h 菌液浓度仍可控制  $A_{560\text{nm}}$  值在 0.3 的范围之内浮动。相比之下, 阳性对照过氧苯甲酰的抑制作用对菌液浓度的变化起伏较大, 但通过比较菌液浑浊度来看, 其抑制效果介于茶树精油和复方精油之间。

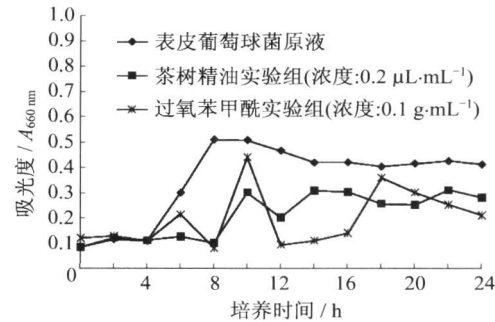


图 2 茶树精油对表皮葡萄球菌的抑制生长曲线  
Fig. 2 Growth of *Staphylococcus epidermidis* with the TTO

从图 3 观察可得, 该痤疮丙酸杆菌在适宜的培养条件下, 生长繁殖过程经历了延迟、对数、稳定、衰亡四个阶段, 表现相当明显。当菌种处于延迟期时, 主要通过调节体内代谢酶系以适应新的环境, 这一时期宏观上看不到菌量变化, 所以生长曲线在开始有一段时期吸光度没有变化。在培养基中添加一定量的 TTO 后, 干扰了菌种正常的生理代谢活动, 从而延长了菌种进入对数生长期的时间, 甚至一定程度上使供试菌致死。在加入 TTO 和对比药物的实验组测试前, 均已进行过数据校正, 以消除 TTO 和对比药物自身浊度对菌液浑浊度的影响。

图 3 中, 未添加 TTO 时, 原菌液培养 4 h 后就进入对数生长期, 大量繁殖, 而添加了适量 TTO 后, 对该菌种出现了较长时间的抑制效果, 12 h 后

菌液浊度才开始逐步上升,但菌种增长率仍能在随后的十多个小时内得到控制,菌种生长曲线呈平稳趋势。相比之下,阳性对照过氧苯甲酰乳膏的抑制效果分别在4、8和16 h出现了一次菌液生长的高峰,但随后又被抑制在较低的范围之内。所以认为过氧苯甲酰的最终抑制效果与TTO相似,但无法达到持久稳定的抑制效果。

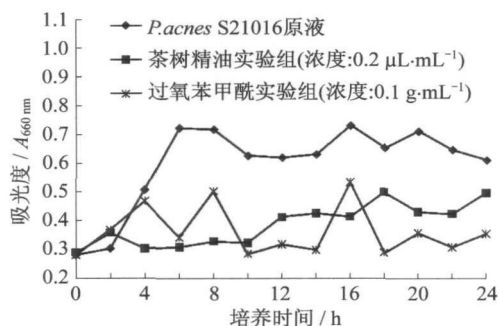


图3 茶树精油对 *P. acnes* S21016 的抑制生长曲线

Fig. 3 Growth of *P. acnes* S21016 with the TTO

### 3 结 论

本试验的定性试验(抑菌圈试验)结果表明,茶树油对所选3种痤疮致病菌均具有比较明显的抑制效果,根据抑菌圈大小,TTO对 *P. acnes* S21016 的抑制作用最强,当TTO用量为4 μL时即可达到高敏的抑制效果,远强于过氧苯甲酰凝胶和克痤隐酮的抑制效果;其次为TTO对金黄色葡萄球菌的抑制作用,在4 μL用量时可达中敏的抑制效果,强于过氧苯甲酰,且与克痤隐酮的效果相差不大;TTO对表皮葡萄球菌的抑制作用稍弱于金黄色葡萄球菌。

定量试验(MIC试验)中,TTO对金黄色葡萄球菌的MIC为0.15 μL·mL<sup>-1</sup>,对表皮葡萄球菌和 *P. acnes* S21016 的MIC均为0.2 μL·mL<sup>-1</sup>。在A. Kunicka-Styczyńska<sup>[9]</sup>的研究中,TTO对金黄色葡萄球菌的MIC为0.04% (V/V),即0.4 μL·mL<sup>-1</sup>,证明本实验所得TTO在抑制金黄色葡萄球菌方面是有良好效果的。

光电比浊法测TTO抑菌生长曲线试验中,未添加TTO和对照药物的菌液约4 h后进入对数生长期,菌液浓度迅速上升,添加了TTO的菌液浓度则增长平缓,并可在一定时间内控制菌液增长率,达到持久稳定的抑菌效果。相对于TTO,2种阳性对照药物的抑菌生长曲线则波动较大,且对菌液增长率的抑制效果弱于TTO。可见,TTO对3种痤疮致病菌的抑制效果是显而易见的。

茶树油是芳疗界公认的抗菌效果较好的植物精油,且茶树油安全性高,经鉴定其纯油可直接使用于皮肤,故常添加于各种日化护肤品中,本文所做研究为将来开发利用茶树油积累了基础数据,但对于茶树油的抑菌机理,尚有待于继续深入研究。

### 参考文献:

- [1] 古佛政, 张燕君. 互叶白千层芳香油的提取和利用研究[J]. 广东林业科技, 1999, 15(3): 33-38.
- [2] 陶凤云, 张新妙, 俞军, 等. 茶树油抗菌作用机理研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(5): 8-13.
- [3] Oliva B, Piccirilli E, Ceddia T, et al. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 37(2): 185-187.
- [4] Ferrarese L, Uccello A, Zani F, et al. Properties of *Melaleuca alternifolia* Cheel antimicrobial activity and phytocosmetic application [J]. *Cosmetic News*, 2006, 29(166): 16-20.
- [5] 朱莲花, 金哲虎. 痤疮丙酸杆菌在痤疮发病中的作用[J]. 中国美容医学, 2006, 15(4): 476-477.
- [6] 齐显龙, 卢涛, 高天文. 痤疮丙酸杆菌相关疾病[J]. 中国美容医学, 2005, 14(4): 515-517.
- [7] 王智昊, 马琳. 金黄色葡萄球菌自身菌苗治疗痤疮2例[J]. 长春大学学报, 2003, 13(3): 16-17.
- [8] 咎文华, 孙剑, 李艳红, 等. 葡萄球菌菌苗治疗痤疮的实验报告[J]. 中国皮肤性病杂志, 2000, 14(6): 392-393.
- [9] Kunicka-Styczyńska A, Sikora M, Kalembe D. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107: 1903-1911.