

치과용 인상재에서의 클로르헥시딘과 에센셜 오일의 항균성능에 대한 상승효과

이광래†

강원대학교 공과대학 화학공학과
24341 강원도 춘천시 강원대학길1
(2017년 7월 31일 접수, 2017년 12월 5일 수정본 접수, 2017년 12월 15일 채택)

Synergy Effect of Chlorhexidine and Essential Oils on Antimicrobial Activity in Dental Impression Materials

Kwang-Rae Lee†

Department of Chemical Engineering, Kangwon National University, 1, Gangwondaehak-gil, Chuncheon-si, Gangwon-do, 24341, Korea
(Received 31 July 2017; Received in revised form 5 December 2017; accepted 15 December 2017)

Abstract – There is growing concern about cross infection among the patients to patients, patients to staffs, and tools to patients in healthcare facilities, especially in dentistry. In this study, the most widely used dental impression materials were prepared and the synergy effect of Chlorhexidine and essential oil on antimicrobial activity was examined in the impression materials. Chlorhexidine concentration of 0.1 wt% and 0.5 wt% showed no antimicrobial activity on *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Candida albicans*. At 1.0 wt% Chlorhexidine, 0% of *E. coli* and 34.7% of *Candida albicans* were survived. Bergamot (Essential oil) concentration of 0.5 wt% and 1.0 wt% showed no antimicrobial activity on *E. coli*. At 2.0 wt% Bergamot oil, 71.9% of *E. coli* were survived. Tea tree oil (Essential oil) of 0.5 wt% showed no antimicrobial activity on *E. coli*. At 1.0 wt% Tea tree oil, 11.2% of *E. coli* was survived. At 2.0 wt% Tea tree oil, no *E. coli* was survived. However, no *E. coli* was survived at the concentration of 0.8 wt% Bergamot with 0.3 wt% Chlorhexidine. At the concentration of 0.8 wt% Tea Tree oil with 0.3 wt% Chlorhexidine, 1.3% of *E. coli* were survived. The experimental results showed that the synergy effects between Chlorhexidine and essential oils on antimicrobial activity were prominent.

Key words: Dental impression material, Chlorhexidine, Bergamot, Tea tree oil, *E. coli*, *Candida albicans*, Antimicrobial, Synergy

1. 서 론

최근 병원에서의 교차 감염에 대한 관심이 높아지고 있다. 치과에서의 진료과정에서 발생할 수 있는 치과 종사자(의사, 간호사)와 환자, 환자와 환자 간의 교차감염에 대한 우려가 크다[1]. 구강치료(스케일링, 충치치료 등)에 사용되는 핸드피스용 수관(water line, 물을 공급하는 관)의 길이는 매우 길고, 물의 사용량은 매우 적기 때문에 수관에 물이 오래 동안 정체되어 있을 수밖에 없는 수관의 배관 구조로 인하여, 건강에 위협적인 박테리아가 빠르게 증식할 수 있다[2]. 또한, 치과의 보철 진료시에 치아의 배열 및 형상을 구현하는 인상채득 과정에서 환자의 구강 내에서 침과 진료과정에서 발생하는 혈액 등과의 접촉으로 인한 교차감염에 대한 우려가 높아지고 있으며, 이에 대한 대책이 요구되고 있다.

병원 및 치과에서는 유기항균제의 일종인 클로르헥시딘(*Chlorhexidine*)과 그 유도체 등이 소독약으로 사용하고 있다. 클로

르헥시딘은 넓은 항균스펙트럼을 지니고 있으며, 그람 음성, 양성 양균에 살균력을 나타낸다. 피부자극작용이 없고, 기구를 부식하지 않기 때문에 1% 수용액을 화농성창상, 피부·점막의 세척, 기구의 소독에 사용하고 있다[3].

최근에는 천연추출물이 *Escherichia coli* (*E. coli*), 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 대하여 우수한 항균활성을 나타낸다는 연구 보고가 있으며[4,5], 항균성을 갖는 암피실린(*Ampicillin*)과 스트렙토마이신(*Streptomycin*)을 첨가하여 제조한 메틸셀룰로오스와 폴리비닐알코올 필름이 포도상 구균과 *E. coli*에 대한 항균활성을 나타낸다는 연구결과가 보고되고 있다[6].

본 연구에서는 치과 보철진료시의 인상재[7]에 의한 채득 과정에서 발생할 수 있는 교차감염을 방지하기 위하여, 유기항균제의 일종인 클로르헥시딘, 식물에서 얻은 천연에센셜 오일인 베르가모트 오일(*Bergamot oil*) 및 티트리오일(*Tea tree oil*)을 각각 첨가하여 치과진료용 인상재를 제조하였다. 그람 음성 세균을 대표하는 *E. coli*와 진핵미생물을 대표하는 캔디다 알비칸스에 대한 이 인상재의 항균활성 실험을 수행하였으며, 클로르헥시딘과 천연에센셜 오일의 항균활성에 미치는 상승효과(synergy effect)를 조사하기 위하

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: krlee@kangwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

여 클로르헥시딘-베르가모트 오일 혼합물 및 클로르헥시딘-티트리 오일 혼합물의 항균활성 실험을 수행하였다.

2. 실험

2-1. 항균성 측정을 위한 인상재 시편 제조

폴리비닐실록산 60 wt%, 폴리수소화실록산 5.1 wt%, 폴리디메틸실록산 3.0 wt%, 플라티늄 촉매 3.5 wt%, 계면활성제 0.8 wt%, 안료 0.1 wt%, 항균제 성분 및 나머지 함량은 디아토마이트(diatomite)와 실란 처리된 SiO₂ 충전재를 혼합하여 치과용 인상재를 제조하였다. 이렇게 제조한 인상재로 직경 18 mm, 두께 2 mm 크기의 인상재 시편을 제조하였다.

2-2. 미생물의 배양

항균실험에 사용한 미생물은 그람음성 세균을 대표하는 *E. coli*와 진핵미생물을 대표하는 칸디다 알비칸스를 사용하였다. 각각의 미생물은 영양배지와 효모배지를 사용하여(Table 1), 30 °C에서 진탕 배양기를 이용하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 미생물은 원심 분리하여 회수하고 여기에 멸균된 인산 완충용액과 글리세롤(10%)을 첨가하여 냉동 보관하였다. 이후 항균실험을 진행할 때 냉동 보관한 균을 상온에서 해동시킨 후 사용하였다.

2-3. 생균수 측정

항균 실험을 실시하기 위하여 인상재 시편을 12 well plate (1 set)에 넣어 블락을 제조하였다. 12 well plate (1 set)에 인산 완충용액에 보관된 *E. coli*, 칸디다 알비칸스를 1 set (6 well plate)에 각각 접종시키고, 30 °C에서 24시간 배양한 후, 웰(well)에 있는 생균수를 측정하였다. 항균성을 측정하기 위하여 배양 후 보관된 미생물을 인산 완충용액으로 적절하게 희석하여 용액을 각 웰(well)에 2 mL씩 넣어주었고, 시료를 동일한 조성의 인산 완충용액으로 10배씩 희석한 다음 1 mL을 취하여 petrifilm에 도말하여 24시간 배양하였다. 24시간 동안 상온에서 방치한 후 배양액을 회수하여 생균수를 측정하였다. 통계처리를 위해 3회에 걸쳐 생균수를 측정하였으며, 이들을 산술평균하여 생균수 평균을 구하였다. 균을 넣자마자 회수한 0시간 시점에서의 생균수와 24시간 후 측정된 생균수로 생존율(survival

rate)을 구하였다. 3회의 생균수 측정치와 산술평균한 생균수 평균값으로 엑셀의 표준편차 함수(STDEV)를 이용하여 생균수 표준편차를 구하였으며, 식 (1)을 이용하여 24시간 배양 후의 균의 생존율을 구하였다.

$$\text{생존율(survival rate, \%)} = \frac{24\text{시간후의 생균수 평균}}{0\text{시간의 생균수 평균}} \times 100 \quad (1)$$

3. 결과 및 고찰

3-1. 유기항균제인 클로르헥시딘의 *E. coli*에 대한 항균성능

클로르헥시딘은 그람음성 및 그람양성 박테리아, 균류(fungi) 등의 살균제로 널리 사용되고 있으며, 박테리아의 성장을 방해하거나, 세포막을 파열시켜 사멸시키는 역할을 한다[8]. 클로르헥시딘은 양성을 띠는 분자로서 음전하를 띠는 세포벽에 붙어서 세포벽을 불안정하게 하여 삼투작용을 방해한다[9]. 저농도에서는 세포벽의 역할에 손상을 입혀서 세포질 막을 공격하여 세포질의 반투과성 막의 성능을 손상시켜 세포질 성분의 누출을 초래하여 세포를 죽게 한다. 고농도에서는 세포질을 영기게 하거나 고형화시키는 역할을 한다[10].

Table 2에 나타난 바와 같이, 유기항균제인 클로르헥시딘의 농도가 0.5 wt% 이하에서는 그람음성을 나타내는 대표적인 미생물인 *E. coli*에 대한 항균성을 나타내지 못하였으나, 1.0 wt%에서 *E. coli*가 모두 사멸하였다.

3-2. 유기항균제인 클로르헥시딘의 칸디다 알비칸스에 대한 항균성능

구강에서의 감염질환인 칸디다증(candidiasis)의 대부분은 진균(곰팡이)류에 속하는 칸디다 알비칸스에 의해 발생한다. 틀니를 사용하거나 소모성 질환 또는 면역질환을 앓고 있는 경우 잘 발생하며, 특히 어린이에게서 흔히 발병한다. 치과진료에서 주로 사용하는 클로르헥시딘은 구강내의 점막, 연조직이나 경조직에 달라붙어서 서서히 방출하여 구강내의 박테리아나 진균 등의 수를 감소시키거나 사멸시키는 소독 역할을 한다[9]. 클로르헥시딘의 진균류에 대한 작용도 박테리아에 대한 작용과 유사하게 세포벽과 세포질 막을 손상시켜서 세포질의 내용물을 유출시켜 진균류를 사멸시킨다[10].

Table 3에 나타난 바와 같이, 유기항균제인 클로르헥시딘의 농도가 0.5 wt% 이하에서는 대표적인 진핵 미생물인 칸디다 알비칸스

Table 1. Culture media and conditions

Microbial strains	Culture media	Cultivation condition	Viable counting
<i>E. coli</i>	Nutrient broth	30 °C for 24 h	3M TM Petrifilm TM Coliform Count Plate
<i>Candida albicans</i>	Yeast medium broth	30 °C for 24 h	3M TM Petrifilm TM Yeast and Mold Count Plate

Table 2. Antimicrobial activity of Chlorhexidine on *E. coli*

Concentration of Chlorhexidine (wt%)	Survival rate after 24 h culture (%)	Remark
0.1	100	No antimicrobial activity
0.5	100	No antimicrobial activity
1.0	0	100% of <i>E. coli</i> are dead

Table 3. Antimicrobial activity of Chlorhexidine on *Candida albicans*

Concentration of Chlorhexidine (wt%)	Survival rate after 24 h culture (%)	Remark
0.05	100	No antimicrobial activity
0.10	100	No antimicrobial activity
0.50	100	No antimicrobial activity
1.00	34.7	65.3% of microbial are dead

에 대한 항균성을 나타내지 못하였으나, 1.0 wt%에서 칸디다 알비칸스의 65.3%가 사멸하였다. 이들 실험 결과(Table 2와 Table 3)로부터 클로르헥시딘의 항균성은 진균류인 칸디다 알비칸스보다 그람음성인 *E. Coli*에 더 효과적임을 알 수 있었다.

3-3. 천연오일인 베르가모트 오일의 *E. coli*에 대한 항균성

천연에센셜 오일 중의 하나인 베르가모트 오일은 그람양성 및 그람음성 박테리아와 *E-coli*에 대한 항균성이 있음이 알려져 있다. 이러한 에센셜 오일이 항균성을 발현하는 기구(mechanism)는 완전히 밝혀지지 않았으나[11], 형태학적인 변화를 유발하는 것으로 알려져 있다. *E. coli*의 외부막이 붕괴되어 에센셜 오일종의 카르바크롤(carvacrol)과 티몰(thymol) 성분에 노출되고[12], 세포질이 부족하게 되어 세포막이 두꺼워져서 과열하게 된다는 것이다[12,13]. 이러한 에센셜 오일은 그람음성 박테리아 보다 그람양성 박테리아에 더 효과적으로 항균성을 나타내는데, 이는 그람음성 박테리아의 외부막의 투과도가 상대적으로 작기 때문이라는 보고가 있으며[14], 이러한 설명이 잘 받아들여지고 있다[15,16].

식물에서 유래한 천연오일인 베르가모트 오일의 그람음성을 나타내는 대표적인 미생물인 *E. coli*에 대한 항균성을 측정하였다. Table 4에서 알 수 있듯이 베르가모트 오일의 농도가 1.0 wt%이하에서는 항균성을 나타내지 못하였으며, 2.0 wt%에서는 *E. coli*의 28.1%가 사멸하였다.

3-4. 천연오일인 티트리오일의 *E. coli*에 대한 항균성

식물에서 유래한 천연오일인 티트리오일은 주로 환상의 모노테르펜(cyclic monoterpenes) 성분으로 구성되어 있으며, 주요성분인 terpinen-4-ol[17]에 의하여 광범위한 항균을 발현하는 것으로 알려져 있다. 모노테르펜은 친유성이므로 세포막에 우선적으로 분포하게 되고 세포막을 팽창시켜 유동성을 증가시킨다. 이렇게 세포막의 구조를 흐트러지게 하여 세포막의 투과도를 증가시키게 된다[18]. 박테리아의 세포질막은 H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} 등의 작은 이온들의 투과를 막는 장벽 역할을 함으로써 이온의 누출을 방지하는 데, 티트리오일에 의한 이러한 세포막 구조의 붕괴로 인하여 세포막의 투과도가 증가하게 되어 K^+ 의 누출을 초래함으로써 미생물의 성장과

번식을 방해할 뿐아니라[19], 세포 외부로부터의 화학성분의 흡수를 증가시키는 역할을 하며, 이러한 작용으로 인하여 항균성 물질의 세포내로의 유입을 증가시킴으로서 항균성을 한층 향상시키는 기능을 한다[18]. 티트리오일은 이러한 세포막 구조에 관련된 역할 뿐 아니라, 미생물의 호흡작용을 방해하는 기능을 가지고 있어 호흡작용에 의한 미생물의 에너지 생산을 저해함으로써 미생물의 성장을 막는 역할을 한다[20].

그람음성을 나타내는 대표적인 미생물인 *E. coli*에 대한 티트리오일의 항균성을 측정하였다. 티트리오일의 농도가 0.5 wt% 이하에서는 항균성을 나타내지 못하였으며, 1.0 wt%에서는 *E. coli*의 88.8%가 사멸하였다. 2.0 wt%에서는 *E. coli* 전부가 사멸하였다.

티트리오일이 베르가모트 오일보다 낮은 농도에서도 *E. coli*에 대한 우수한 항균성을 나타내는 것을 알 수 있었으며, 이는 티트리오일의 potassium ions (K^+)의 누출, 호흡작용 방해, 세포 외부로부터의 화학성분의 흡수를 증가시키는 역할에 의한 항균성 물질의 세포내로의 유입을 향상시키는 기능에 의한 것으로 판단된다.

3-5. 클로르헥시딘-베르가모트 혼합물의 *E. coli*에 대한 항균성

유기항균제인 클로르헥시딘은 0.5 wt%이하일 경우 *E. coli*에 대한 항균력이 발현되지 않았으며(Table 3), 천연오일인 베르가모트 오일의 농도가 1.0 wt% 이하에서 항균력이 발현되지 않았다(Table 4). 그러나, 베르가모트 오일 0.5 wt%와 클로르헥시딘 0.1 wt%를 함께 첨가하면(Table 6) 99.3%의 *E. coli*가 사멸하였다. 또한, 베르가모트 오일 0.8 wt%와 클로르헥시딘 0.3 wt%를 함께 첨가하면 *E. coli* 전부가 사멸하였다(Table 6). 이는 클로르헥시딘과 베르가모트 오일을 각각 단독으로 사용하였을 경우에는 높은 농도에서도 항균력이 발현되지 않으나, 두 성분을 함께 사용하였을 경우 낮은 농도에서도 우수한 항균력을 나타내는 상승효과(synergic effect)가 있음을 알 수 있었다.

3-6. 클로르헥시딘-티트리오일 혼합물의 *E. coli*에 대한 항균성

유기항균제인 클로르헥시딘의 농도가 0.5 wt%이하일 경우 *E. coli*에 대한 항균력이 발현되지 않았으며(Table 3), 천연오일인 티트리오일의 농도가 0.5 wt%이하에서는 항균력이 발현되지 않았다

Table 4. Antimicrobial activity of Bergamot on *E. coli*

Concentration of Bergamot (wt%)	Survival rate after 24 h culture (%)	Remark
0.5	100	No antimicrobial activity
1.0	100	No antimicrobial activity
2.0	71.9	28.1% of <i>E. coli</i> are dead

Table 5. Antimicrobial activity of Tea Tree oil on *E. coli*

Concentration of Tea Tree oil (wt%)	Survival rate after 24 h culture (%)	Remark
0.5	100	No antimicrobial activity
1.0	11.2	88.8% of <i>E. coli</i> are dead
2.0	0	100% of <i>E. coli</i> are dead

Table 6. Antimicrobial activity of Chlorhexidine-Bergamot on *E. coli*

Concentration of Mixtures (wt%)	Survival rate after 24 h culture (%)	Remark
Bergamot (0.5 wt%) + Chlorhexidine (0.1 wt%)	0.7	99.3% of <i>E. coli</i> are dead
Bergamot (0.8 wt%) + Chlorhexidine (0.3 wt%)	0	100% of <i>E. coli</i> are dead
Bergamot (1.0 wt%) + Chlorhexidine (0.5 wt%)	0	100% of <i>E. coli</i> are dead

Table 7. Antimicrobial activity of Chlorhexidine-Tea Tree oil on *E. coli*

Concentration of Mixture (wt%)	Survival rate after 24 h culture (%)	Remark
Tea Tree oil (0.5 wt%) + Chlorhexidine (0.1 wt%)	14.9	85.1% of <i>E. coli</i> are dead
Tea Tree oil (0.8 wt%) + Chlorhexidine (0.3 wt%)	1.3	98.7% of <i>E. coli</i> are dead
Tea Tree oil (1.0 wt%) + Chlorhexidine (0.5 wt%)	1.3	98.7% of <i>E. coli</i> are dead

(Table 5). 그러나, Table 7에서 알 수 있듯이 클로르헥시딘 0.1 wt%와 티트리오일 0.5 wt%를 함께 첨가하면 85.1%의 *E. coli*가 사멸하였다. 또한, 클로르헥시딘 0.3 wt%와 티트리오일 0.8 wt%를 함께 첨가하면 98.7%의 *E. coli*가 사멸하였다. 이는 천연오일인 티트리오일과 유기항균제인 클로르헥시딘을 각각 단독으로 사용하였을 경우에는 높은 농도에서도 항균력이 발현되지 않았으나, 두 성분을 함께 사용하였을 경우에 낮은 농도에서도 우수한 항균력을 나타내는 상승효과(synergy effect)가 있음을 알 수 있었다. 이는 티트리오일이 potassium ions (K^+)의 누출 기능, 호흡작용 방해 기능, 세포 외부로부터의 화학성분의 흡수를 증가시키는 역할에 의한 항균성 물질의 세포내로의 유입을 향상시키는 기능[19,20]에 의한 것으로 판단된다.

4. 결 론

유기항균제인 클로르헥시딘과 천연오일인 베르가모트 오일, 티트리오일을 각각 단독으로 사용했을 때 보다 유기항균제와 천연오일을 혼합하여 사용할 경우가 훨씬 낮은 농도에서도 우수한 항균력을 가지는 것을 알 수 있었다. 클로르헥시딘은 0.5 wt% 이하의 농도에서는 *E. coli*에 대한 항균력이 발현되지 않으며, 베르가모트 오일의 농도가 1.0 wt% 이하에서 항균력이 발현되지 않았다. 그러나, 클로르헥시딘 0.1 wt%, 베르가모트 오일 0.5 wt%를 함께 첨가하면 99.3%의 *E. coli*가 사멸하였다. 이는 클로르헥시딘-베르가모트 오일 혼합물이 높은 항균력을 나타냄을 말해준다. 티트리오일의 농도가 0.5 wt%이하에서는 항균력이 발현되지 않았지만, 클로르헥시딘 0.1 wt%와 티트리오일 0.5 wt%를 함께 첨가하면 85.1%의 *E. coli*가 사멸하였다. 클로르헥시딘-티트리오일 혼합물이 높은 항균력을 나타냄을 알 수 있었다. 이는 티트리오일이 potassium ions (K^+)의 누출, 호흡작용 방해, 세포 외부로부터의 화학성분의 흡수를 증가시키는 역할에 의한 항균성 물질의 세포내로의 유입을 향상시키는 기능에 의한 것으로 판단된다. 이것은 유기항균제와 천연오일을 혼합하여 두 성분을 함께 사용할 경우에 낮은 농도에서도 우수한 항균력을 나타내는 상승효과(synergy effect)가 있음을 알 수 있었다.

감 사

“2016년도 강원대학교 대학회계 학술연구구성비로 연구하였음 (관리번호-520160078)”.

References

1. Woo, S. H. and Joo, E. J., “A Study on Personal Protection Equipment for Infection Control at Dental Offices,” *J. Korean Soc. Dental Hygiene*, **10**(3), 459-464(2010).
2. Pankhurst, C. L. and Coulter, W. A., “Do Contaminated Dental

- Unit Waterlines Pose a Risk of Infection?,” *J. Dentistry*, **35**(9), 712-720(2007).
3. Jeansonne, M. J. and White, R. R., “A Comparison of 2.0% Chlorhexidine Gluconate and 5.25% Sodium Hypochlorite as Antimicrobial Endodontic Irrigants,” *J. Endodontics*, **20**(6), 276-278(1994).
4. Noh, D., Joe, S., Yang, H., Han, D., Kim, J. and Kim, D., “Antimicrobial Activity and Safety Test of Natural Extract Including Phellodendro Namurense, Eucommia Ulmides Oliv Extracts,” *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**(6), 762-766(2016).
5. Kim, H., Shin, H., Hwang, D., Lee, J., Bak, M., Kim, J. and Kim, D., “Antimicrobial Activity and Safety Test of Mixed Plant Extracts Including Phellodendron Amurense and Eucommia Ulmides Oliv,” *Korean Chem. Eng. Res.*, **51**(5), 536-539(2013).
6. Choi, J. H., Choi, Y. S., Oh, I. H., Kim, M. S. and Lee, I. H., “Preparation and Characterization of Antimicrobial Films Using Water Soluble Polymer,” *Korean Chem. Eng. Res.*, **49**(4), 449-455(2011).
7. Flanagan, D. A., Palenik, C. J., Setcos, J. C. and Miller, C. H., “Antimicrobial Activities of Dental Impression Materials,” *Dental Materials*, **14**(6), 399-404(1998).
8. Mangram, A. J., Horan, T. C., Pearson, M. L., Silver, L. C. and Jarvis, W. R., “Guideline for Prevention of Surgical Site Infection,” *United States. CDC.*, **20**(4), 247-278(1999).
9. Puig Silla M, Montiel Company JM. and Almerich Silla JM., “Use of Chlorhexidine Varnishes in Preventing and Treating Periodontal Disease: a Review of the Literature,” *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, **13**, E257-60(2008).
10. McDonnell, G. and Russell A. D., “Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance,” *Clinical Microbiol. Reviews*, **12**(1), 147-179(1999).
11. Holley, R. A. and Patel, D., “Improvement in Shelf-life and Safety of Perishable Foods by Plant Essential Oils and Smoke Antimicrobials,” *Food Microbiol.*, **22**, 273-292(2005).
12. Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. and Wright, A. V., “Characterisation of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-negative Bacteria,” *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3590-3595(1998).
13. Rasooli, I., Rezaei, M. B. and Allameh, A., “Ultrastructural Studies on Antimicrobial Efficacy of Thyme Essential Oils on *Listeria Monocytogenes*,” *Int. J. Infect. Dis.*, **10**, 236-241(2006).
14. Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L., “Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils and Essences Against Five Important Food-borne Pathogens,” *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**, 122-188(1998).
15. Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G., “Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils,” *Int. J. Food Microbiol.*, **74**, 101-109(2002).
16. Burt, S., “Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods,” *Int. J. Food Microbiol.*, **94**, 223-253(2004).

17. Southwell, I. A., Hayes, A. J., Markham, J. L. and Leach, D. N., "The Search for Optimally Bioactive Australian Tea Tree Oil;" *Acta Hort.*, **334**, 265-275(1993).
18. Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. and 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).
19. Cox, S. D., Gustafson, J. E., Mann, C. M., Markham, J. L., Liew, Y. C., Hartland, R. P., Bell, H. C., Warmington, J. R. and Wyllie, S. G., "Tea Tree Oil Causes K^+ Leakage and Inhibits Respiration in *Escherichia coli*;" *Lett. in Appl. Microbiol.*, **26**, 355-358(1998).
20. Trumppower, B. L. and Gennis, R. B., "Energy Transduction by Cytochrome Complexes in Mitochondrial and Bacterial Respiration: the Enzymology of Coupling Electron Transfer Reactions to Transmembrane Proton Translocation;" *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 675-716(1994).