

수복재의 항균효과에 관한 연구

* 원광대학교 치과대학 치과보존학교실

** 원광대학교 치과대학 구강해부학교실

정희일* · 임미경* · 최라영* · 한두석**

Abstract

A STUDY ON THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF RESTORATIVE MATERIALS

Hee - Il Jeong, D. D. S.*, Mi - Kyung Im, D. D. S.,

La - Young Choi, D. D. S., M. S. D.*, Du - Seok Han, D. V. M., M. S., Ph. D.**

* *Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wankwang University*

** *Department of oral Anatany, College of Dentistry, Wankwang University*

The purpose of this study was to investigate the antibacterial effect of zinc oxide eugenol(ZOE), zinc phosphate cement(ZPC), glass ionomer cement, resin, and Vitapex to *S. muntans*, *S. sanguis*, *S. fecalis* and *E. coli* by agar diffusion method.

Four wells were punctured in mitis - salivarius agar plate per each group and each wells were filled with restorative matetials.

The width of inhibition zones produced in mitis - salivarius agar were measured as the parameter of the antibacterial effect after 16 hours and 40 hours.

In *S. mutans* and *S. sanguis*, the largest inhibition zone was produced on ZOE, followed by glass ionomer cement, and ZPC.

Inhibition zones was not observed in resin and Vitapex.

In *S. fecalis*, ZOE and glass ionomenr cement showed wider inhibition zone than ZPC.

In *E. coli*, ZOE showed wider inhibition zone than ZPC, but no inhibition zone was observed on glass ionomer cement.

I. 서 론

와동벽을 완벽히 폐쇄하는 수복재는 없으며 이들 사이에는 세균이 침입할 수 있는 틈이 존재한다. 따라서 수복재와 시멘트가 항균효과를 갖게되면 수복물의 수명을 연장시킬 수 있다는 점에서 중요한 의의를 갖는다. 와동벽과 수복재 사이의 세균의 미

세누출에 관한 여러 연구에서 세균은 항균효과가 없는 충전재 하방에서 생존가능하며, 이러한 지속적인 미생물의 성장이 재차 우식을 일으키는 중요한 원인으로 보고되었다¹⁻⁴⁾.

치아를 삭제한 직후에 소독하면 세균을 제거할 수 있다는 점에서 와동 청결제를 사용해야 한다는 주장이 있었으나⁵⁻⁷⁾, 삭제된 직후의 상아질 면에는

세균이 없는 상태에서 와동 형성후 와동 세척제를 일상적으로 사용하는 것은 그 효과면에서 의문이 제기된다⁸⁻¹⁰⁾. 또한 Vielstra¹¹⁾도 시험관내에서 우식이 없는 와동을 세균으로 오염시킨 뒤에 물과 공기만으로(air - water spray) 와동 표면을 세척한 결과 효과적으로 세균을 제거할 수 있다고 하였다.

따라서 수복재나 시멘트가 와동벽을 완벽히 폐쇄하고 또한 세균성장의 유효한 억제제로 작용하는 성질을 갖는다면 유리할 것이다. 생물학적 특성과 더불어 이장재의 항균효과는 체계적으로 연구하는 것이 필요하다¹²⁾.

생체내에서 실험적으로 형성한 와동 하방에서 나타난 치수 염증은 재료 자체의 화학적 자극성 뿐만 아니라 수복재와 와동벽 사이 경계면에서 생긴 세균의 침입에도 영향을 받는다¹³⁾.

Agar overlay method는 생체재료의 세포독성을 평가하는 방법으로 Guess¹⁴⁾에 의해 소개된 이래 최근까지 널리 사용되고 있는데 agar diffusion inhibitory test(ADT)이와 유사하다고 볼 수 있다. 그러나 각각 다른 방법으로 다양한 세균에 대해 이루어진 결과를 서로 비교하는 것은 어렵다.

Turkheim은¹⁵⁾ 대부분의 치과 재료에서 화학반응이 지속되는 한도내에서는 세균을 죽이는 효과가 있다고 보고했으며, zinc oxide가 강한 항균력을 가지며, eugenol과 결합되면 더욱 강한 항균효과를 나타낸다고 했다. 또한 McCue¹⁶⁾은 silicate, 아말감, acrylic material이 갖는 정균효과(bacteriostatic activity)의 지속시간은 물에 접촉하면 급격히 감소하며, 배지의 조성성분이 항균효과를 결정하는 중요한자라고 지적했다. Tobias¹⁷⁾은 ADT를 이용한 치과 재료의 항균효과를 실험하였는데, ferret plaque에서 6종의 세균을 분리하여 사용하였다. 막 혼합한 재료에서는

세균에 따라 다양한 정도의 항균효과가 나타났다. 모든 재료에서 경화된 후 시간이 경과함에 따라 상당한 정도로 항균효과가 감소하고, in vitro에서 수복재의 항균효과는 in vivo에서 치수 자극성과 역상 관계가 있다고 보고했다.

이에 저자는 streptococcus의 선택배지인 mitis-salivarius agar에 균을 도포하고 well을 만든뒤 충전시켜, ADT방법으로 16시간과 40시간 경과후 각각 억제대를 측정하여 항균력을 평가해 보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

본 실험에서 사용한 수복재는 Table 1과 같다.

균주로는 표준균주인 streptococcus sanguis(ATCC 10556)와 Streptococcus mutans(ATCC 10449), 타액에서 분리한 Streptococcus fecalis와 E. coli를 사용하였다.

면양혈액한천지(blood agar plate)에 순수배양한 각 균주를 thioglycollate broth에 37°C에서 약 16시간 배양하였다. 자가 제조한 mitis-salivarius(M-S) agar에 소독된 Pasteur pipet과 핀셋으로 지경 6mm, 깊이 4mm의 well을 만들었다. M-S agar 1개에 4개의 well을 뚫었다. 멸균된 면봉으로 증균된 thioglycollate broth에 충분히 적신후 M-S agar에 60° 각도로 3회 도포하였다. 수복재 한가지를 각각 8개의 well에 충전시켰다. ZOE는 이장(base)이나 임시수복(temporary filling)에 쓰이는 정도의 점조도(consistency)를 사용하였고, ZPC의 점조도는 금관이나 Inlay를 합착할 때 쓰이는 정도로 하였다.

Glass ionomer cement는 shade No.23을 사용하여 제조회사의 지시대로 혼합하였으며 점조도는 ZPC와

Table 1. Kinds of restorative materials and cements

restorative materials	manufacturer
zinc oxide eugenol (ZOE) cement	MOYCO Industries Inc., USA
zinc phosphate cement (ZPC)	FLECK's Zinc cement, USA
glass ionomer cement	GC Fuji II, GC International Corp., Japan
resin (HI-POL)	부평치과화학공업사, Korea
Vitapex	Neo Dental Chemical Products Co., Japan

mean* (SD**)

유사하게 사용하였다. Resin은 universal paste와 catalyst paste를 1:1의 비율로 혼합하였다.

Vitapex는 튜브의 끝 부위를 소독된 가위로 잘라서 직접 well에 충전하였다.

37°C 세균배양기(신성사 SH-1008)에 배양한 후 약 16시간과 40시간 후에 well주위에 세균성장억제대(inhibition zone)가 생겼는지 관찰하고, vernier caliper로 억제대를 측정하였다.

III. 실험성적

실험재료를 M-S배지의 well에 충전한 뒤 16시간, 40시간 후에 억제대(Inhibition zone)를 관찰하여 Table 2-5의 결과를 얻었다.

16시간 경과후 *S. mutans*에 대한 억제대의 크기는 ZOE가 11.14mm, Glass ionomer cement가 8.45mm, ZPC가 8.04mm로 나타났고, resin과 Vitapex는 억제대를 형성하지 않았다. *S. sanguis*에 대한 억제대는 *S. mutans*보다 약간 크게 나타났는데, ZOE가 12.18mm, Glass inomer cement가 10.15mm, ZPC가 8.41mm이었다. 역시 resin과 Vitapex는 억제대를 형성하지 않았다.

Table 2. Inhibition zone (mm) of 5 restorative materials to *S. mutans*

	ZOE	ZPC	G.I.cement	resin	Vitapex
16 hours	11.14* (0.73)*	8.04 (0.63)	8.45 (0.25)	0 (0)	0 (0)
40 hours	11.56 (0.91)	8.20 (0.71)	8.75 (0.70)	0 (0)	0 (0)

mean* (SD**)

Table 3. Inhibition zone (mm) of 5 restorative materials to *S. sanguis*

	ZOE	ZPC	G.I.cement	resin	Vitapex
16 hours	12.18 (0.47)	8.41 (0.43)	10.15 (0.78)	0 (0)	0 (0)
40 hours	11.98 (0.53)	8.26 (0.52)	10.30 (0.82)	0 (0)	0 (0)

Table 4. Inhibition zone (mm) of 5 restorative materials to *S. fecalis*

	ZOE	ZPC	G.I.cement	resin	Vitapex
16 hours	11.84 (0.24)	9.01 (0.49)	12.54 (0.80)	0 (0)	0 (0)
40 hours	11.73 (0.73)	9.07 (0.49)	11.33 (0.78)	0 (0)	0 (0)

Table 5. Inhibition zone (mm) of 5 restorative materials to *E.coli*

	ZOE	ZPC	G.I.cement	resin	Vitapex
16 hours	14.90 (0.06)	9.03 (0.24)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
40 hours	14.88 (1.40)	8.39 (0.43)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*E. coli*에서는 16시간 경과 후 ZOE가 14.90mm, ZPC가 9.03mm의 억제대가 나타났고, resin과 Vitapex는 억제대를 형성하지 않았다. 또한 G. I. Cement도 억제대를 형성하지 않았다. 사용한 4가지 균주에서 모두 40시간이 경과시 16시간 경과균에 비하여 억제대의 변화는 크지 않았다. *S. mutans*와 *S. sanguis*에서는 ZOE, G. I. Cement, ZPC순으로 큰 억제대가 관찰되었으나, *S. fecalis*에서는 G. I. Cement가 ZOE보다 큰 억제대를 형성하여, G. I. Cement, ZOE, ZPC순으로 억제대가 나타났다.

IV. 총괄 및 고찰

충치를 치료하는 것이 수복 술식에서는 중요하며 주조 수복물을 합착(cementation) 하는 경우도 있다. 이상적인 시멘트는 변연부 적합성이 우수하고 치수에 진정작용이 있으며, 항균효과가 있어야 한다. 또한 부착능(adhesion), 강도, 타액에 대해 불용성이며 심미성도 우수해야 한다.

수복재의 항균력, 특히 용혈효과는 생체적합성과 역상관계에 있다. 또한 항균력 평가시 영향을 미치는 변수로서 한천배지의 조성을 고려해야 한다. 이것은 반응생성물에 의한 억제 뿐만 아니라, 한천 내로 항균제로 작용하는 성분이 확산되는 정도에도 의존하기 때문이다¹⁷⁾.

Dahl은¹⁸⁾ 시멘트가 타액내 세균에 대한 항균효과를 가진다고 하였으며, 그 결과로서 시멘트의 항균효과에 의해 생체내에서 세균총(bacterial flora)의 조성이 영향을 받을 수 있다고 했다.

Qvist는¹⁹⁾ 타액에서 분리한 균을 한천배지에서 실험한 결과 Concise 레진은 정균효과(bacteriostatic effect)가 없다고 보고하였다. 반면 Orstavik등²⁰⁾은 12종류의 resin과 1종류의 silicate시멘트의 항균력을 5종의 균주에 대하여 평가하였다. 모든 재료들이

혼합한 직후에는 약간의 항균력을 가지나 경화되어 보관되면 항균력이 크게 감소된다고 보고하였고, 수복재의 항균력이 치태의 세균조성에 영향을 미쳐 생체내에서 수복물 주변의 재차 우식의 발생을 조절한다고 하였다.

Meeker는²¹⁾ calcium hydroxide 이장제의 항균효과는 페놀 화합물에 기인한 것으로 보고했다. Calcium hydroxide 표면의 pH가 항균력의 지시체는 아니며, 높은 pH는 유리된 calcium hydroxide가 있다는 것을 의미한다. 따라서 표면의 pH가 높다는 것이 항균력이 높다는 것은 아니며, 항균력은 hydroxyl 이온의 총량과 방출속도에 의해 결정된다고 볼 수 있다고 하였다.

McComb등²²⁾은 수종의 시멘트의 항균효과 연구에서 경화시 산성 pH를 갖는 glass ionomer cement이 실험대상으로 한 모든 세균에 대해 가장 강한 항균효과를 보인다고 하였다.

이외에도 수복재의 항균효과를 높이기 위해 Beagrie등²³⁾과 Schwartzman등²⁴⁾, Jedrychowski등²⁵⁾은 polycarboxylate cement에 chlorhexidine을 첨가하여, 복합레진과 glass ionomer cement에 chlorhexidine을 첨가하여 항균효과가 증가됨을 보였다.

ADT 방법의 단점은 정균효과(bacteriostatic effect)와 항균효과(bactericidal effect)를 비교할 수 없다는 점이다²⁶⁾.

ADT 방법으로 항균력 평가시 중요한 변수로서 Barry등²⁷⁾은 접착성, 분자량, 확산, 균수, 시간, 배지성분, 온도, 측정시의 문제와 검사한 세균의 종류 등에 관하여 기술한 바 있다. 접착성에 있어서는 well안의 실험재료와 인접 gel이 잘 접착해야 하는데 특히 재료가 경화된거나 고체 상태인 경우에 더욱 중요하다. 또한 시험 재료안의 항균성분의 분자량은 gel이 쉽게 확산될 수 있는 크기와 형태 뿐 아니라 전기부하(charge), 농도, agar gel의 점도, 온도와

이온농도에도 의존한다. 세 균을 배지에 접종하는 양(inoculum density)이 일정해야만 신뢰성있고 재현성 가능한 결과를 얻을 수 있다.

세균 억제대의 크기는 세균이 증식하기 이전에 항균제가 확산되는 정도에 달려 있다. 즉 well에서 항균제의 농도와 확산계수(diffusion coefficient)가 억제대 크기를 결정하는 중요한 인자가 된다. 만약 균의 성장속도가 빠르게 하는 배지를 쓰면 억제대가 작게 나타나고, 반대로 균의 성장속도가 느리면 억제대가 크게 나타날 수 있기 때문이다. 각 plate에 붓는 배지의 양도 일정해야 한다.

배지의 깊이는 Barry 등²⁷⁾이 4mm를 사용해야 한다고 했으며 본 실험에서도 4mm well을 사용하였다. 이것은 수복제가 확산초기에는 확산 방향이 3차원적으로 일어나므로 배지의 깊이가 너무 크게 측방으로 확산될 수 있는 성분이 상대적으로 감소하므로 억제대가 작게 나타나기 때문이다. 또 너무 얇으면 반대로 큰 억제대가 나타난다. 억제대를 측정시 대부분은 억제대가 원형으로 나타나므로 억제대의 직경을 측정하지만, 불규칙한 억제대가 나타나는 경우는 2개의 서로 직각되는 직경을 측정한 뒤 계산하는 방법이 쓰이기도 한다²⁷⁾.

M-S agar는 통성 혐기성 세균(facultative anaerobes)중 Streptococci를 배양하기 위한 선택배지이다. 저자는 면양혈액 한천배지(blood agar plate)와 M-S배지를 사용한 결과, 세균증식 억제대 판정이 면양혈액 한천배지에서는 어려워 M-S배지를 선택하였다. 본 실험에 사용한 3종의 streptococci는 M-S배지에서 약 16시간 배양하면 균이 충분히 자랐다. 세균증식 억제대는 둥글게 원을 그리며 나타났는데, 수복제의 충전 형태에 따라 불규칙한 경계를 형성하기도 하였다. 또한 세균 증식이 불충분한 경우에는 정확히 억제대가 나타나지 않아 측정하기 어려운 점도 있었다. M-S배지는 자가제조하여 사용하였다. 본 실험에서는 Pasteur pipet의 뒤쪽을 알코올에 가열한 후 이미 굳어있는 고체상태의 배지에 well을 만들었다.

세균증식 억제대를 측정할 때, 단순히 충전제가 확산하여 생기는 확산대와 구별해야 한다. 충전제는 배지 표면 뿐만 아니라, 배지 속으로도 침투하여 약 16시간이 지나면 확산대(diffusion zone)가 형성된다. 그러나 경화시간이 짧은 충전제는 급방 굳어 버리기

때문에 확산대를 형성하지 못한다. 특이할 만한 것은 경화시간이 가장 긴 Vitapex는 전혀 확산대를 형성하지도 않고, 세균증식 억제대도 형성하지 않은 점이다. 한가지 고려해야 할 점은 세균증식 억제대는 수복제의 항균력 뿐만이 아니라, 확산능력에 의해 좌우될 수 있으므로 사용한 배지에서 잘 확산되는 지가 중요하다. 그러나 대부분의 수복제는 경화시간이 빨라 곧 굳어버리기 때문에 확산능이 떨어진다고 볼 수 있다.

본 실험에서 사용한 5종의 수복제중 확산대를 형성한 것은 ZPC와 glass ionomer cement이었다. 저자는 thioglycollate broth에 수복제를 넣고, 증균액 약간을 넣고 잘 섞은 후 한천배지에 접종했으나 만족할 만한 결과를 얻지 못하였다. 즉 thioglycollate broth내에서도 수복제는 충분히 녹지 않아 고체상태로 존재하기 때문에 세균에 접촉할 수 있는 상태가 적어 정확히 항균효과를 기대하기 힘들었다.

S. mutans와 S. sanguis에 대한 항균효과는 ZOE가 가장 강하게 나타났으며, ZPC와 Glass ionomer cement는 비슷한 정도의 항균력을 나타내었고, resin과 Vitapex는 세균억제대(inhibition zone)가 관찰되지 않았다. 반면 S. feacalis에서는 ZOE와 G. I. cement이 비슷한 정도로 큰 세균증식 억제대를 형성하였고, ZPC가 그 다음 순으로 나타났다. E. coli는 ZOE, ZPC순으로 세균증식 억제대가 크게 나타났다. 반면 G. I. cement는 세균증식 억제대가 나타나지 않고 확산대만 관찰되었다.

40시간 경과 후에도 16시간 경과균에 비하여 세균증식 억제대가 큰 변화가 없었는데, 이는 실험에 사용한 모든 재료들이 16시간 정도이면 확산을 완료하여 더 이상의 확산이 일어나지 않기 때문이라고 생각된다.

Schwartzman 등²⁸⁾의 실험에서도 ZOE, ZPC의 순으로 S. mutans에 대한 항균력이 나타났고, composite resin에서는 항균효과가 나타나지 않았다. 또한 Branstrom 등³⁰⁾은 조직학적 검사에서 ZOE cement로 임시정착한 금관 하방에서 세균이 존재하지 않음을 보였다. ZOE 시멘트가 강한 항균력을 갖는 이유는 혼합물내에서 eugenol의 자유도가 크기 때문인 것으로 보인다³¹⁾. 따라서 eugenol의 활성도는 cement내에 국한된 것은 아니다. 본 실험에서 사용한 Hipol복합레진은 세균억제대가 관찰되지 않았는데,

Orstavik등²⁰⁾의 실험에서도 제품에 따른 항균력의 차이를 보고한 바 있다. 일반적으로 레진의 항균력을 레진 성분의 조성차이로 설명하고 있다.

ADT 방법을 수복재의 항균효과를 비교하는 표준 방법으로 사용하려면 그 방법을 표준화해야 할 것이다. 또한 Meryon등²⁸⁾의 model cavity system은 실제 임상에서와 비슷한 실험방법으로 소개되고 있다. 수복재는 일단 구강안에서는 타액에 의해 계속 용해되므로 강한 항균력이 있어도 쉽게 타액에 용해된다면 이 부위에서 미세누출이 일어나 세균이 급속히 성장하는 환경을 제공한다. 따라서 항균력과 더불어 용해성을 감소시키는 노력도 배가해야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

ZOE, ZPC, Glass Ionomer cement, resin, Vitapex 5종의 재료의 *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. fecalis*, *E. coli*에 대한 항균력을 비교하기 위해 mitis-salivarius배지에 각 균주를 도포한 후, well을 만들어 측정되었다.

16시간과 40시간동안 세균 배양기에서 배양한 후 세균증식억제대를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *S. mutans*와 *S. sanguis*에서는 세균증식 억제대는 ZOE, G. I. cement, ZPC순으로 크게 나타났다.
2. 4종으로 균주 모두에서 Resin, Vitapex는 억제대를 형성하지 않았다.
3. *S. fecalis*에서는 세균증식억제대는 ZOE와 G. I. cement가 비슷한 크기로 나타났고, ZPC가 그 다음 순이었다.
4. *E. coli*에서는 세균증식 억제대는 ZOE, ZPC순이었으며, G. I. cement는 억제대를 형성하지 않았다.

참고문헌

1. Turkheim HJ : Bacteriological investigations on dental filling materials. British Dental Journal 95 : 1, 1953.
2. Brannstrom M : Communication between the oral cavity and the dental pulp associated with

restorative treatment. Operative Dent 9 : 57, 1984.

3. Brannstrom M : The cause of postrestorative sensitivity and its prevention. J Endod 12 : 90, 1986.
4. Fisher FJ : The viability of microorganisms in carious dentin beneath amalgam restorations. J Dent 121 : 90, 1966.
5. Brannstrom M, Nyborg H : Pulpal protection by a cavity liner applied as a thin film beneath deep silicate restorations. J Dent Res 50 : 90, 1971.
6. Brannstrom M, Nyborg H : Cavity treatment with a microbicidal fluoride solution : growth of bacteria and effect on the pulp. J Pros Dent 30 : 303, 1973.
7. Eriksen HM, Leidal TI : Monkey pulpal response to composite resin restorations in cavities treated with various cleaning agents. Scand J Dent Res 87 : 309, 1979.
8. Mjor IA : The penetration of bacteria into experimentally exposed human coronal dentin. Scand J Dent Res 82 : 191, 1974.
9. Mjor IA : Histologic demonstration of bacteria subjacent to dental restorations. Scand J Dent Res 85 : 169, 1977.
10. Mjor IA : Bacteria in experimentally infected cavity preparations. Scand J Dent Res 85 : 599, 1977.
11. Vielstee JR, Sidway DA, Plant CG : Cavity cleansers - a simple in vitro test. Brit Dent J 149 : 293, 1980.
12. American Dental Association. Guide to Dental Materials and Devices, 8th ed, Chicago, 0.145, 1976.
13. Tobias RS, Brown RM, Wilson CA : Antibacterial activity of dental restorative materials. Int Endo J 18 : 161, 1985.
14. Guess WL, Rosenbulth SA, Schmid B, Aution J : Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. J Pharma Science 54 : 1545, 1965.

15. Turkheim HJ : Bacteriological investigations on dental filling material. *Brit Dent J* 95 : 1, 1953.
16. McCue RW, McDougal FG, Shay DE : The antibacterial properties of some dental restorative materials. *Oral Surg, Oral Med, Oral Path* 4 : 1180, 1951.
17. Tobias RS : Antibacterial properties of dental restorative materials. *Int Endo J* 21 : 155, 1988.
18. Dhal BL : Antibacterial effect of two luting cements on prepared dentin in vitro and in vivo. *Acta Odontol Scand* 36 : 363, 1978.
19. Qvist V, Qvist J : marginal leakage along Concise in relation to filling procedure. *Scand J Dent Res* 85 : 305, 1977.
20. Orstavik D, Hensten - Pettersen A : Antibacterial activity of tooth - colored dental restorative materials. *J Dent Res* 57 : 171, 1978.
21. Meeker HG, Majafi MM, Linke HAB : Germicidal properties of dental cavity liners, bases and cements. *General Dent* 34 : 474, 1986.
22. McComb D, Ericson D : Antimicrobial action of new, proprietary lining cements. *J Dent Res* 66 : 1025, 1987.
23. Beagrie GS, Smith DC : development of a germicidal polycarboxylate cement. *J canad Dent Ass* 44 : 409, 1978.
24. Schwartzman B, Caputo AA : Enhancement of antimicrobial action of polycarboxylate cement. *J Prosth Dent* 48 : 171, 1982.
25. Jadrychowski JR, caputo AA, Kerper S : Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehan* 10 : 373, 1983.
26. Tobias RS : Antibacterial properties of dental restorative materials : a review. *Int Endod J* 2 : 155, 1988.
27. Barry AL : Agar diffusion test. The antimicrobial susceptibility test : principles and practices, pp.163-213, Lea and Febiger, Philadelphia, 1976.
28. Meryon SD, Browne RM : In vitro cytotoxicity of a glass ionomer cement of a new generation. *Cell Biochem Func* 2 : 43, 1984.
29. Schwartzman B, Caputo AA, Schein B : Antimicrobial action of dental cements. *J Prosth Dent* 43 : 309, 1980.
30. Brannstrom M, Nyborg H : Pulp reaction to a temporary zinc oxide eugenol cement. *J Prosth Dent* 35 : 185, 1976.
31. Molnar EJ : Residual eugenol from zinc oxide - eugenol compounds. *J Dent Res* 46 : 645, 1967.