

미생물의 근관내 상아질 부착에 대한 주사전자현미경적 연구

정상균 · 오태석 · 배광식

서울대학교 대학원 치의학과 치과보존학교실

ABSTRACT

SEM STUDY ON THE BACTERIAL ADHESION TO THE DENTIN OF THE ROOT CANAL

Sang-Kyun Jeong, Tae-Seok Oh, Kwang-Shik Bae

Dept. of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

On the instrumented root canal wall, amorphous, irregular *smear layer* can be observed with Scanning Electron Microscope(SEM). The purpose of this study was to evaluate the effect of the presence or absence of smear layer on the adhesion of *Staphylococcus aureus* to the dentin of the root canal.

Human incisors, extracted within 7 days, with no caries, no fracture, no calcification of canal, were selected. After cutting crown portion at cemento-enamel junction, root canal preparation was done by modified crown-down technique using Profile and Gates - Glidden Drill. During canal preparation, 10ml physiologic saline solution(group1&3) or 10ml 3.5% NaOCl(group. 2&4) was used as irrigation solution. And 10ml physiologic saline solution(group1&3) or 10ml 0.5M EDTA(group2&4) was applied for final flush. After vertical sectioning and ethylene oxide gas sterilization, samples(group1&2) were immersed into BHIYHM broth inoculated with *Staphylococcus aureus* (ATCC 31153) and incubated for 3hrs at 37°C. All samples were prepared for and observed with SEM(JEOL JSM840S).

The data were analyzed by Mann-Whitney rank sum test.

Group	N	Smear layer	Inoculation	Mean±SD(/432µm ²)*
1	10	remained	yes	4.97 ± 6.63
2	10	removed	yes	22.12 ± 12.33
3	2	remained	no	
4	2	removed	no	

Group 1&2 : experimental group

Group 3&4 : control group

*The : number of attached *S. aureus* per an image (mag. of ×5,000)

The conclusions are as follows :

1. Smear layer covers entire root canal surface after root canal preparation.
2. Smear layer has been removed away and the entrances of dentinal tubules have opened widely, when applying 0.5M EDTA and 3.5% NaOCl.
3. A significantly higher number of bacteria were adhered to the root canal dentin without smear layer(P<0.0001).
4. Smear layer produced during root canal preparation impedes bacterial adhesion and colonization to dentin matrix, therefore inhibits canal reinfection.

Key words : smear layer, bacterial adhesion, root canal dentin, SEM

I. 서 론

미생물 감염으로 인한 치수 및 치근단 질환에서 미생물의 제거와 재감염의 방지가 궁극적인 치료의 원칙이라 할 수 있다. 그러나, 근관내의 미생물에 관한 활발한 연구가 이루어지지 못하여, 아직까지 정립된 이론이 없는 실정이다. Nair(1987), Molven(1991), Sen(1995) 등은 전자현미경을 통하여 감염근관의 내부를 관찰하였는데, 미생물들이 근집을 이루어 치태와 비슷한 형태로 근관벽에 부착한 조건과^{20,24,25)}, 상아세관내로의 침투조건도 보고하였다^{11,27)}.

근관형성시 근관내 상아질벽에는 항상 도말층(smear layer)이 형성되는데²⁸⁾, McComb과 Smith(1975)가 이를 처음으로 관찰하여, 치관부의 도말층과 비슷한 구조임을 밝혔다¹⁸⁾. 도말층은 상아질, 치수조직 잔사, 상아세포돌기, 때로는 미생물 등으로 구성되며¹⁸⁾, 주사전자현미경(scanning electron microscope)상으로는 비구형적이며, 무정형의 구상(granular)구조물로 관찰된다³⁾.

근관치료시 대부분의 미생물은 근관형성과 관주를 통하여 제거가 가능하나^{4,29)} 제거되지 않고 남은 미생물들은 근관충전이 시행되기까지의 기간에 증식을 할 수 있다³⁰⁾. 따라서 미생물의 증식을 억제할 수 있는 조건이 연구되어왔는데, 특히, Michelich(1979) 등은 도말층(smear layer)이 미생물의 상아세관내로의 침투를 억제한다고 하였고^{19,23,26)}, White(1984) 등은 도말층이 상아세관으로의 세균침투를 효과적으로 방지하여 근관의 재감염을 예방, 제한 할 수 있다고 주장하였다³¹⁾. Haapasalo(1987) 등은 감염된 상아세관의 소독과 근관충전시 미세누출의 감소를 위하여 도말층 제거의 필요성을 주장하였고^{12,14)}, Calas(1994,1998) 등은 도말층이 미생물의 부착을 오히려 증가시킨다고 하였다^{6,7)}.

본 연구에서는 발거한 사람의 단근치를 이용, 근관형성을 통한 도말층의 생성을 유도한 후 이를 제거한 군과 제거하지 않은 군간의 *Staphylococcus aureus*에 대한 부착정도를 주사전자현미경으로 관찰하고자한다. 지금까지 사용되었던 실험방법에 비하여 보다 임상적 환경에 가까운 실험방법을 고안, 신빙성 있는 연구결과를 기대할 수 있도록 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. Preparation of samples

치주질환이나 외상 등의 원인으로 발거된 상, 하악 절치 12개를 사용하였다. 사용된 치아는 모두 우식, 파절, 근관 협착 등을 보이지 않는 단근치만을 선택했으며, 발거후 치주조직을 소파하고 생리 식염수에 보관하였다.

각 치아의 치관부를 백악법랑경계(cemento-enamel junction)부위에서 절단하고, Profile (Maillefer,

Ballaigues, Switzerland), Gates - Glidden drill을 이용하여 MAF(master apical file) 60번까지 modified crown-down technique으로 근관형성을 시행하였다. 1군과 3군은 10ml의 생리식염수를, 2군과 4군은 10ml의 3.5% NaOCl을 근관관주용액으로 사용하였으며, 근관형성 완료후 1,3군은 10ml의 생리식염수로, 2,4군은 10ml의 0.5M EDTA용액으로 마지막 관주(final flush)를 시행하였다(Table 1). 근관내면이 손상되지 않도록 조심스럽게 치근을 수직절단하고, EO(ethylene oxide) gas sterilization을 하였다. 모든 시편은 무균 증류수에 보관하여, 시편의 건조와 오염을 방지하였다.

2. Inoculation of samples

영하 70℃의 deep-freezer에 보관하던 *Staphylococcus aureus*(ATCC 31153)를 Rabbit blood Columbia agar plate에서 2일간 culture 후, BHIYHM(brain heart infusion with yeast extract, hemin and menadione) broth에 부유시켜 다시 하루동안 culture하였다. 20개의 실험군 시편을 균주가 고르게 부유된 broth에 완전히 잠기게 한 뒤, 37℃에서 3시간동안 incubation했다^{6,7)}. 무균증류수를 이용, 시편의 표면에 부착되지 않은 균주와 불순물 등을 세척한 후 2.5% glutaraldehyde에 30분간 고정하였다.

3. Sample preparation for SEM

고정이 끝난 시편은 완충액(0.1M phosphate buffer)으로 세척한 뒤 에틸알코올(ethyl alcohol)을 통한 단계적 탈수과정과 임계점건조(critical point dry)를 시행하였다. 미리 건조시켜놓은 대조군과 함께, 모든 시편의 근관내측 표면에 탄소와 금을 이용한 이중피막(carbon-gold coating)을 형성, 주사전자현미경관찰을 위한 준비를 완료하였다.

4. SEM observation

주사전자현미경(JSM-840S, JEOL, Tokyo, Japan)을

Table 1. Classification of samples

Group	Number	Smear layer	Inoculation
1	10	remained	yes
2	10	removed	yes
3	2	remained	no
4	2	removed	no

*Group 1 & 2 : experimental group

Group 3 & 4 : control group

통하여 대조군의 전반적인 근관내의 상태를 관찰하였으며, 실험군은 치관부에서 치근단부까지 5구역으로 나누어 각 구역당 2곳을 무작위로 선정, 총 200개의 image에서 부착되어 있는 *Staphylococcus aureus*의 개수, 모양, 상아세관 및 도말층과의 관계 등을 관찰, 비교, 분석하였다($\times 1,000 \sim \times 10,000$).

III. 실험결과

1. 대조군의 관찰

3군은 도말층이 근관내 상아질 표면 전체를 덮고 있는 소견이 관찰되었으며(Fig. 1), 4군은 도말층이 완전히 제거되

고, peritubular dentin의 일부가 제거되어 상아세관의 입구가 확연하게 드러나는 양상을 보였다(Fig. 2). 대조군의 관찰을 통하여, 실험과정 중 시편의 처리에서 문제점이 없었음을 확인할 수 있었다.

2. 실험군의 관찰

모든 실험군에서 구형의 *Staphylococcus aureus*가 근관벽에 부착하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 3, 4), 각 군에서의 부착된 균 개수는 Table 2와 같다.

1군과 2군의 실험값을 Mann-Whitney rank sum test를 통하여 분석한 결과 통계학적으로 유의성 있는 차이를 나타내었다($P < 0.0001$). 1군에서는 도말층에 불규칙적으로

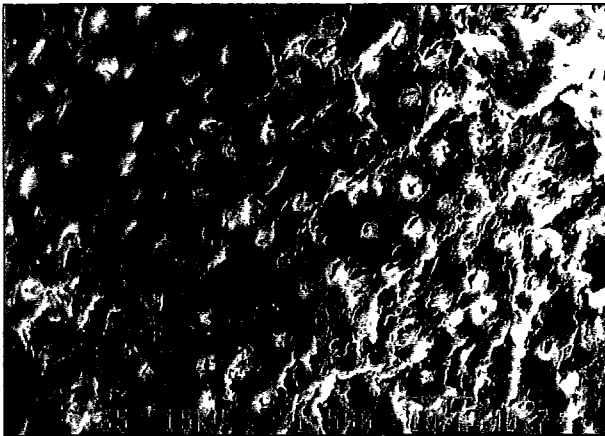


Fig. 1. SEM image of group 3: Smear layer covers root canal dentin irregularly (original magnification $\times 1,500$).

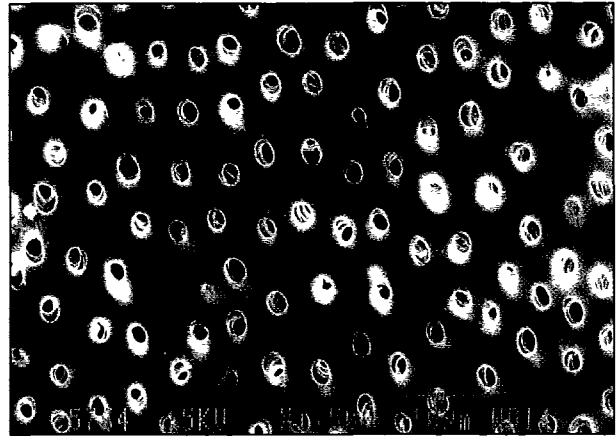
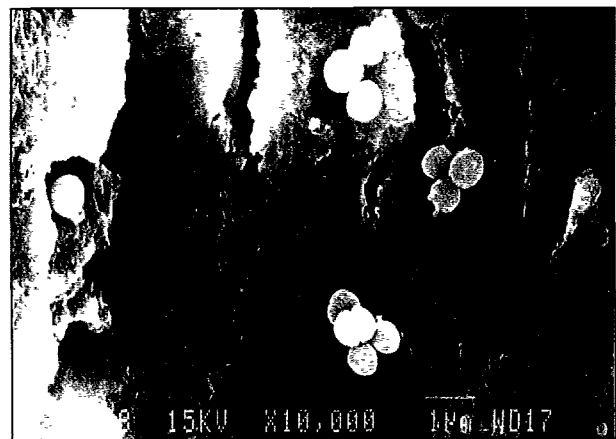


Fig. 2. SEM image of group 4: Clean surface of root canal wall and opened dentinal tubules (original magnification $\times 1,500$).

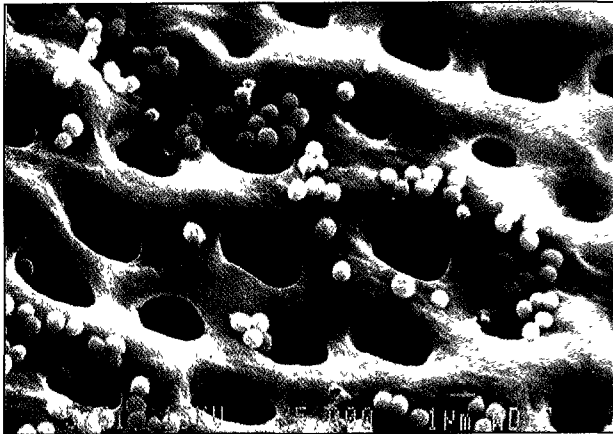


(a)

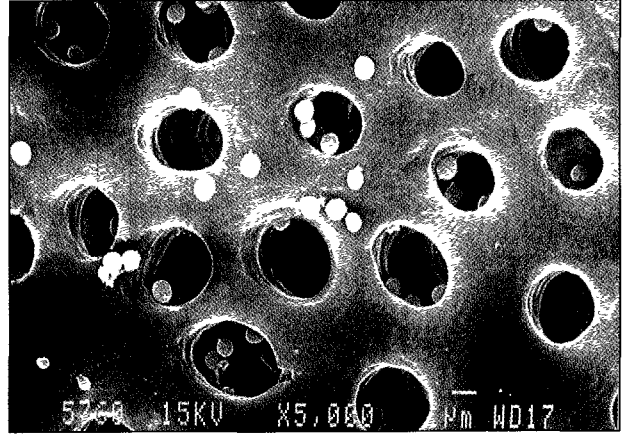


(b)

Fig. 3. SEM image of group 1: Cells adhere to smear layer (a : original magnification $\times 3,000$, b : original magnification $\times 10,000$).



(a)



(b)

Fig. 4. SEM image of group 2: Cells adhere to dentin and penetrate into dentinal tubules (a, b : original magnification $\times 5,000$).

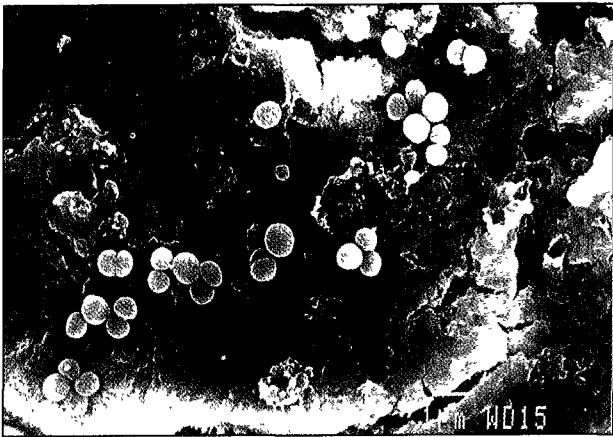


Fig. 5. SEM image of group 1: Cut dentin surface, not root canal wall. Very irregular and rough smear layer, many cells adhere to it (original magnification $\times 7,000$).

균들이 부착되어 있는 소견을 보였으며(Fig.3), 100개의 image중 21개의 image에서 부착된 균이 없는 것으로 관찰되었다($\times 5,000$). 2군에서는 상아세관 개구부위에 비교적 많은 균들이 부착하여 군집을 이루고 있었고, 상아세관 내부로 침투(penetration)하는 양상을 보였다(Fig. 4).

IV. 총괄 및 고안

근관치료의 과정중 근관형성은 감염된 치수조직과 상아질을 제거하여 근관충전에 적절한 형태와 조건을 형성하는데 그 목적이 있다. 그러나 근관형성 과정중 반드시 생겨나는 도말층에 대한 지식이나 연구가 아직은 미흡한 상태에 있는

Table 2. Comparison of mean number of cells counted per observation spot of 100 images (magnification of $\times 5,000$).

Group	Mean ($/432\mu m^2$)	Standard deviation
1	4.97	6.63
2	22.12	12.33

것이 사실이다. 또한 치수 및 치근단 병변의 가장 중요한 인자인 미생물과의 관계는 도말층의 성질을 결정할 수 있는 요소라 할 수 있다.

본 실험의 결과에 따르면, 도말층의 존재가 미생물의 부착과 상아세관내로의 침투를 방해하는 physical barrier로 작용하고 있다는 사실을 알 수 있다. 1군과 2군의 평균 실험값이 4배 정도의 차이를 보였으며, 도말층이 제거되어 노출된 상아세관 개구부에는 많은 수의 미생물들이 부착, 침투하는 소견을 관찰할 수 있었다. 따라서, 도말층을 유지하는 것이 상아세관의 재감염을 감소 시킬 수 있다는 결론을 얻을 수 있다.

그러나, 이전의 연구 중 본 실험과는 상반된 결과를 보고한 경우도 있다. Calas(1994,1998) 등은 도말층이 제거된 근관벽에 미생물의 부착이 유의성 있게 줄었다고 보고하여^{6,7)} 도말층 제거의 타당성을 주장하였다. 반면, Drake(1994) 등은 도말층 제거시 미생물의 부착이 10배 정도 증가한 것을 관찰⁹⁾, 본 실험과 유사한 결과를 보고하였다. 또한, Love(1996)등은 도말층과 미생물부착과는 직접적인 상관관계가 없다고 설명하면서, 단지, 개방된 상아세관은 더욱 많은 수의 미생물을 포함할 수 있어 상아질 감염의 위험을 증가시킨다고 하였다¹⁶⁾.

그렇다면, 유사한 방법의 연구가 정반대의 결과를 보이는

이유는 무엇일까? 미생물의 종류, 배양조건, 시편의 상태, 관찰의 방법 등 실험과정에서의 차이에서 기인할 가능성이 있다. 또한, 도말층의 차이에서도 그 원인을 유추해볼 수 있는데, Calas(1994,1998)등의 실험에서는 carbide bur를 사용하여 10~15 μ m의 두꺼운 도말층을 형성, 통상적인 근관형성시 나타나는 1~5 μ m의 도말층^{10,17)}과는 많은 차이를 보이고 있다. Fig. 5는 1군에서 근관내벽이 아닌 절단된 치근상아질의 표면에 부착한 미생물을 관찰한 것으로, 같은 시편의 근관내 도말층부위에 비해 많은 수의 미생물을 발견할 수 있었다. 이는 동일한 조건하에서 얇고 균일한 도말층에 비해, 거칠게 형성된 불규칙하고 두꺼운 도말층에 미생물 부착이 증가할 수 있음을 입증하고 있다. 그러나, 이러한 추론들도 명확한 이유로 제시되기에는 부족한데, 이는 미생물이 치아경조직에 부착하는 기전이 완전히 밝혀지지 못한 이유에서이다. 지금까지의 연구로는 미생물 표면과 경조직 표면사이의 복잡한 상호작용(complex interaction)-소수성(hydrophobic) 상호작용과 전하성(charge) 상호작용의 비특이적(nonspecific) 상호작용과 세균 표면의 polypeptide adhesin과 specific ligand를 인식하는 receptor를 포함하는 특이적(specific) 상호작용으로 나눌 수 있는¹³⁾⁻¹⁷⁾이 관여한다고 알려진 정도이다¹⁶⁾.

이에 저자는 지금까지의 연구방법들을 면밀히 검토하여, 보다 신빙성 있는 결과를 유도하기 위한 최선의 실험방법을 계획하게 되었다. 우선 발거한지 7일 이내의 사람의 치아를 선택한 후, 우식, 파절, 근관협착등을 보이는 치아는 배제하였으며, 생리식염수에 보관하여 건조를 방지했다. 임상시술 시와 동일한 기구를 사용하여 근관형성을 시행하였고, 근관내의 도말층 제거에 가장 효과적인 방법으로 입증된 EDTA와 NaOCl을 사용하였다^{2,8,33,35)}. 전과정에 걸쳐 시편의 오염, 변성등을 철저히 차단하였으며, 특히 소독방법에 있어서 EO gas를 이용, 시편표면의 변화를 최소화하였다⁹⁾. 시편의 관찰방법으로는 방사선동위원소부착방법(radioactive labeling method)이 아닌 주사전자현미경을 사용함으로써, 근관벽 표면의 상태와 부착한 미생물의 관계를 더욱 자세히 관찰할 수 있었으며, 정확한 미생물의 수를 직접 측정할 수 있었다. 또한, 실험 균주인 staphylococcus species는 감염근관과 치근단 염증조직의 분석결과 통성 혐기성균주의 13.6%를 차지하는 것으로, 근관감염의 주요원인균주의 하나로 알려져 있다¹⁾.

지금까지 연구된 결과들을 토대로 도말층의 특징을 요약해보면 다음과 같다²⁸⁾.

1. 도말층의 구성

근관형성시 생성되는 도말층은 치관부 도말층의 경우와는 다르게 상아질만으로 이루어지지 않는다. 상아세포돌기,

치수조직, 미생물과 그 부산물 등이 포함될 수 있으며¹⁸⁾, 특히, 근관형성 초기에 생성된 도말층에는 유기물질의 구성이 비교적 높다²⁸⁾. Mader(1984)등은 도말층을 표층 도말층과 상아세관내로 압입된 도말층의 두 부분으로 구분하였는데, 후자는 상아세관내로 40 μ m까지 압입된 소견을 보인다고 보고하였다¹⁷⁾. 그러나, 근관의 상태-감염, 석회화 정도-에 따라 도말층 구성성분의 변화가 나타날 수 있어, 더욱 심도있는 연구가 필요하다 하겠다.

2. 도말층과 미생물과의 관계

본 연구의 결과에서도 알 수 있듯이, 도말층은 미생물의 상아질 부착을 방해한다. Vojinovic(1973), Michelich(1980) 등도 도말층이 덮고 있는 상아세관으로는 미생물의 침투가 일어나지 않음을 보고 하였다^{19,32)}. 그러나, 도말층 자체가 미생물을 완전히 차단하지는 못하는 것으로 알려져 있는데³⁴⁾, Uitto(1998) 등은 일부의 미생물이 분비하는 단백질 분해 효소(proteolytic enzyme)에 의해 도말층이 분해될 수 있으며, 결과적으로 근관벽과 근관충전물 사이에 미세누출을 야기할 수 있다고 하였다³¹⁾.

3. 도말층과 근관소독약제와의 관계

감염이 심한 근관에서는 상아세관내로의 미생물침투가 관찰되며, 일부는 근관형성 후에도 상아질내에 잔존할 수 있다^{4,5)}. 따라서, 여러종류의 근관소독약제가 사용되고 있는데, Baumgartner(1987), Yamada(1983) 등은 도말층이 근관소독약제의 작용을 방해할 수 있다고 보고하였다^{2,35)}. 그러나, Orstavik(1990)등은 도말층이 근관소독약제의 작용을 지연시킬 수는 있어도, 완전히 차단하지는 않는다고 결론지었다²²⁾.

4. 도말층과 미세누출

근관벽에 잔존해있는 도말층은 근관충전제(sealer)의 상아세관내 침투와 상아질접착을 물리적으로 방해할 수 있다^{15,21)}. 그러나, 근관충전제의 상아세관내로의 침투와 미세누출의 직접적인 상관관계에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다. 단, 도말층 자체가 비균질적(nonhomogenous)이며 약점착성(weakly-adherent)의 구조로 되어있어, 서서히 분해되어 근관벽과 근관충전제사이에 누출을 야기할 수 있다¹⁷⁾.

도말층의 처리방법을 임상적으로 적용하는데는 여러 가지 논란이 있을 수 있다. 도말층을 제거한 경우, 임시가봉의 누출이 발생하면 근관재감염의 위험성이 증가할 수 있으며, 도말층을 잔존시킨 경우, 도말층내의 미생물이 증식하거나

근관충전후 미세누출을 증가시킬 위험이 뒤따른다. 따라서, 근관형성시 미생물을 완전히 배제할 수 있도록 시술하며, 도말층은 근관충전 직전에 EDTA와 NaOCl을 이용하여 제거하는 것이 가장 바람직한 술식이라고 결론 지을 수 있다.

V. 결 론

근관형성시 근관벽에 형성되는 도말층이 미생물의 근관상아질 부착에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 알아보고자 본 연구를 진행하였다. 발거한 사람의 단근치를 선택하여 치관부를 제거하고 근관형성, 도말층제거(2, 4군), 치근수직절단, EO gas 소독을 순차적으로 시행하였으며, *Staphylococcus aureus*가 부유된 BHI broth에 inoculation 시켜 3시간동안 incubation한 후 통상의 과정을 거쳐 주사전자현미경으로 관찰, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 근관형성 후 근관상아질 표면 전체는 도말층으로 덮혀있는 양상을 보였다.
2. 0.5M EDTA와 3.5% NaOCl을 적용하여 근관내 도말층을 효과적으로 제거할 수 있었으며, 상아세관 개구부가 확연히 노출되어 있는 소견을 관찰할 수 있었다.
3. 도말층을 제거한 군에서 미생물의 부착이 유의성있게 높았으며(P<0.0001), 노출된 상아세관내로 미생물이 침투하는 소견을 보였다.
4. 근관상아질을 덮고 있는 도말층이 미생물의 부착과 침투를 감소시켜, 근관재감염을 억제함을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endo J* 1998; 31:39-47.
2. Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endodon* 1987; 13:147-57.
3. Brannstrom M, Nordenvall KJ, Glantz PO. The effect of EDTA-containing surface-active solutions on the morphology of prepared dentin: an in vivo study. *J dental Res* 1980;59:1127-31.
4. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981;89:321-8.
5. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18:35-40.
6. Calas P, Rochd T, Druilhet P, Azais JM. In vitro adhesion of two strains of *Prevotella nigrescens* to the dentin of the root canal. *J Endodon* 1998;24:112-115.
7. Calas P, Rochd T, Michel G. In vitro attachment of *Streptococcus sanguis* to the dentin of the root canal. *J Endodon* 1994;20:71-74.
8. Cengiz T, Aktener BO, Piskin B. The effect of dentinal tubule orientation on the removal of smear layer by root canal irrigants. A scanning electron microscopic study. *Int Endo J* 1990;23:163-71.
9. Drake DR, Wiemann AH, Rivera EM, Walton RE. Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. *J Endodon* 1994;20:78-82.
10. Goldman LB, Goldman M, Kronman JH, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: A scanning electron microscopic study. *Oral Surg, Oral Med, Oral Path* 1981;52:197-204.
11. Gutierrez JH, Jofre A, Vollena F. Scanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1990;69:491-501.
12. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.
13. Jenkinson HF. Adherence and accumulation of oral streptococci. *Trends in Microbiology* 1994;2:209-12.
14. Karagoz-Kucukay I, Bayirli G. An apical leakage study in the presence and absence of smear layer. *Int Endo J* 1994;27:87-93.
15. Lester KS, Boyde A. Scanning electron microscopy of instrumented, irrigated and filled root canals. *British Dent J* 1997;143:359-67.
16. Love RM. Adherence of *Streptococcus gordonii* to smeared and nonsmeared dentine. *Int endodon J* 1996;29:108-112.
17. Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J Endodon* 1984;10:477-83
18. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endodon* 1975;1:238-42.
19. Michelich VJ, Schuster GS, Pashley DH. Bacterial penetration of human dentin in vitro. *J Dent Res* 1979;59:1398-1403.
20. Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1991;7:226-229.
21. Oksan T, Aktener BO, Sen BH, Tezel H. The penetration of root canal sealers into dentinal tubules. A SEM study. *Int Endo J* 1993;26:301-5.
22. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endo Dent Trauma* 1990;6:142-9.
23. Pashley DH, Michelich V, Khel T. Dentin permeability: effects of smear layer removal. *J Prosthet Dent* 1981;46: 531-7.
24. Nair NPR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endodon* 1987;13:29-39.
25. Nair NPR, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular Bacteria and fungi in root filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: A long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endodon* 1990;16:580-588
26. Safavi KE, Spangberg L, Langeland K. Smear layer removal effects on root canal dentin tubule infection. *J Endodon* 1989;15:175.
27. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endodon Dent Trauma* 1995;11:6-9.
28. Sen BH, Wesselink PR, Trukun M. The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. *Int Endo J* 1995;28:141-148.
29. Sjogren U, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of ultrasonic root canal instrumentation. *Oral Surg* 1987;63:366-70.

30. Sundqvist H. Endodontic microbiology. In: Spanberg LSW, ed. Experimental endodontics. Boca Raton, FL: CRC press, 1990:131-53.
31. Uitto VJ, Haapasalo M, Laakso T, Salo T. Degradation of basement membrane collagen by proteases from some anaerobic microorganisms. *Oral Micro Imm* 1998; 3:97-102.
32. Vojinovic O, Nyborg H, Brannstrom M. Acid treatment of cavities under resin fillings: bacterial growth in dentinal tubules and pulpal reactions. *J Dent Res* 1973;52:1189-93.
33. White RR, Goldman M, Lin P. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials. *J Endodon* 1984;10:558-62.
34. Williams S, Goldman M. Penetrability of the smeared layer by a strain of *Proteus vulgaris*. *J Endodon* 1985;11:385-8.
35. Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: part III. *J Endodon* 1983;9:137-42.