

Erythrosine의 농도와 LED 조사 시간에 따른 *Enterococcus faecalis*에 대한 세균치사 효과

이시영^{1,3}, 이민선^{2,3}, 마득상^{2,3}

¹강릉원주대학교 치과대학 미생물학 및 면역학교실, ²강릉원주대학교 치과대학 예방치학교실, ³강릉원주대학교 구강과학연구소

Photodynamic bactericidal effect against *Enterococcus faecalis* by erythrosine concentration and LED irradiation times

Si Young Lee^{1,3}, Min-Sun Lee^{2,3}, Deuk-Sang Ma^{2,3}

¹Departments of Oral Microbiology, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, ²Departments of Preventive and Public Health Dentistry, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, ³Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Korea

Received: October 6, 2014
Revised: December 2, 2014
Accepted: December 15, 2014

Corresponding Author: Deuk-Sang Ma
Department of Preventive and Public Health Dentistry, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, 7 Jukheon-gil, Gangneung 210-702, Korea
Tel: +82-33-640-3194
Fax: +82-33-640-3103
E-mail: mads@gwnu.ac.kr
*This research was funded by cooperative clinical research fund in 2013 (CR1302) of Gangneung-Wonju National University Dental Hospital.

Objectives: The purpose of this study was to provide photodynamic bactericidal effect against *Enterococcus faecalis* by erythrosine concentrations and LED irradiation times.

Methods: Erythrosine was used as a photosensitizer and green LED (3 Watt, 520-530 nm) was used as light source. *E. faecalis* ATCC 1943 and *E. faecalis* ATCC 29212 were used in this study. Approximately 10^5 CFU of bacteria were added in wells of a 96-well microtitration plate. For examining the effects of concentrations of erythrosine, 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 μ M of erythrosine were added in wells containing bacteria. The irradiation time with LED was 30 sec. In another set of experiment, the effect of irradiation time for killing of bacteria was investigated by increasing irradiation time from 0 to 30 s with 10 μ M of erythrosine final concentration. After irradiation, each sample was serially diluted with PBS and 50 μ l of diluents was spread on duplicate blood agar plates. The plates were incubated for 72 h at 37°C under aerobic conditions and the number of CFU was determined. The experiments were repeated four times. The results were analyzed using one-way ANOVA, and Tukey's multiple comparison at a significance level of 0.05.

Results: When the erythrosine concentrations were more than 2.5 μ M, *E. faecalis* ATCC 29212 was significantly decreased ($P < 0.05$). The more erythrosine concentrations increased, the more *E. faecalis* ATCC 1943 decreased statistically significantly ($P < 0.05$). In another set of experiment, when LED irradiation time was more than 20 s, *E. faecalis* ATCC 1943 decreased significantly ($P < 0.05$), and if the irradiation times was more than 5 s, *E. faecalis* ATCC 29212 decreased significantly ($P < 0.05$).

Conclusions: PDT using erythrosine and green LED was found to be an effective method in killing *E. faecalis*.

Key Words: *Enterococcus faecalis*, Erythrosine, LED, Photodynamic therapy

서론

염증성 구강질환은 구강 내 미생물에 의해 발생하고, 정상적

상주미생물의 질서가 무너짐으로 치아우식증이나 치주염으로 발전이 빠르게 진행하게 된다¹⁻³. 특히 *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)는 그람 양성 세균으로 구강 내 상주균으로 존재하지만,

세 번째로 흔한 원내감염 원인균으로서 임상적 중요성을 갖으며⁴⁾, 근관치료 후 근관치료의 약제에 내성이 있고 영양결핍이 지속되어도 생존 가능하여 근관치료 실패에 있어 중요한 요인이 될 수 있다⁵⁾. 또한 근관치료 후 난치성 치근단 치주염과 같은 치주염을 야기할 수 있기 때문에^{6,7)}, 이러한 이유로 *E. faecalis*를 제거하기 위한 연구들이 이뤄지고 있다.

구강미생물에 의한 근관 내 감염을 방지하기 위한 방법으로 항균제를 이용한 근관세정과 근관 내 약제의 사용이 추천되어 왔지만, 근관의 형태적 복잡성으로 기구 및 세정제의 도달이 어려워 세균의 완전한 제거에는 한계가 있으며⁸⁻¹⁰⁾, *E. faecalis*는 근관 내 약제로 흔히 사용되는 수산화칼슘에 높은 저항력을 갖는다¹¹⁾. 또한 근관 내 감염방지를 위한 대안으로 레이저를 통한 항균효과를 들 수 있는데, 조사된 레이저 빛이 근단공을 넘어설 경우 치아지지 조직과 치아 근처의 이공과 하악 신경관 같은 구조물에 위해를 일으킬 수 있다¹²⁾.

이러한 단점은 광감작제(photosensitizer)를 사용하여 이에 민감한 세균을 사멸함으로써 극복할 수 있는데, 이러한 방법이 광역학치료(photodynamic therapy, PDT)이다. 그 원리는 체내의 산소와 외부에서 공급되는 광원, 그리고 그 빛에 민감한 광감작제를 이용하는 것으로, 광감작제를 세균과 접촉시키고 이를 활성화시킬 수 있는 적절한 파장의 광원을 적용하여 일중항산소(singlet oxygen)와 유리기(free radical)를 형성함으로써¹³⁾, 사람의 정상 세포에는 영향을 미치지 않으며 세균에 대한 항균효과를 기대할 수 있다^{14,15)}. 따라서 최근에 근관의 미생물을 목표로 하는 PDT의 적용 가능성에 대한 연구가 활발하다¹⁶⁻¹⁸⁾.

PDT에 대한 연구들에서 광원(light source)으로 helium/neon gas laser, light-emitting diode (LED) 등이 다양하게 사용되고 있고, 광감작제로 haematoporphyrin, phthalocyanine, toluidine blue O, erythrosine 등이 연구되고 있으며¹⁹⁾, methylene blue와 적색 광원의 *E. faecalis* 정균효과도 확인되었다¹⁶⁾. 그러나 대부분의 광감작제가 인체사용에 있어 한계점을 가지고 있는 반면에 erythrosine은 치과에서 치면착색제로 널리 사용되며 인체에 무해하기 때문에 그 편의성과 안전성을 갖고 있다. Erythrosine을 광감작제로 사용하는 것에 대해 의견이 분분하지만, 이를 광감작제로 하여 LED를 이용한 연구에서 구강 세균에 대한 효과가 입증되고 있으므로 치료효과에서도 광감작제로서 이점이 있을 수 있다²⁰⁾. 그러나 *E. faecalis*에 대한 erythrosine의 효과에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 치면착색제로 널리 이용되고 있는 erythrosine을 이용한 PDT가 *E. faecalis*에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 광감작제와 광원

광감작제는 erythrosine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하고, 광원은 파장이 520-530 nm인 3 watt 녹색

(green) LED (Photron Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하였다.

2. 세균과 배양조건

한국구강미생물자원은행(Chosun University, Gwangju, Korea)으로부터 *E. faecalis* ATCC 1943과 *E. faecalis* ATCC 29212를 제공받았다. 세균들은 Brain Heart Infusion broth (BHI; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에서 37°C 호기환경 하에 18시간 동안 배양하였다. 분광광도계 (Smart Plus 2700, Young-woo Inst., Seoul, Korea)를 이용하여 660 nm에서 세균현탁액의 탁도를 측정하였다. 미리 준비한 표준곡선(탁도 vs. 세균 수)으로 세균수를 측정하였으며, 세균은 PBS (phosphate buffered saline)를 이용하여 1×10^7 CFU/ml로 희석하였다.

3. 광감작(Photosensitization) 과정

약 10^5 CFU의 세균을 96-well microtitration plate (SPL Lifesciences, Pocheon-Si, Gyeonggi-Do, Korea)의 well에 추가하였다. Erythrosine의 농도에 따른 효과를 검사하기 위해, 각각 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0 μ M의 erythrosine을 세균이 포함된 wells에 주입하였다. 모든 군에서 녹색 LED를 이용하여 광원을 30초간 조사하였다. 세균사멸에 있어서 광원의 조사시간에 따른 효과를 평가하기 위하여, 10 μ M의 erythrosine이 주입된 배지에 0-30초로 광원조사 시간을 증가하면서 측정하였고, 광원과 표본과의 조사거리는 1 cm이었다. 각 실험군은 duplicate wells로 구성하였다. 광조사 후, 각 표본들은 PBS를 이용하여 희석하고, 희석액의 50 μ l을 duplicate blood agar plates (Hanil-KOMED, Sungnam, Gyeonggi-Do, Korea)에 도말하였다. Plates는 37°C 호기환경 하에 72시간 동안 배양하고 automatic colony counter (IUL, Barcelona, Spain)를 이용하여 CFU를 측정하였다. 실험은 4회 반복하였다.

4. 통계분석

각 군 간의 차이를 비교하고자 one-way ANOVA를 시행하였고, Tukey 사후분석을 시행하였다. 통계분석프로그램으로 PASW 19.0을 사용하였다.

연구성적

1. PDT 적용 후 표준균주 별 erythrosine 농도에 따른 세균 수

Erythrosine을 넣지 않은 것과 비교하였을 때, *E. faecalis* ATCC 1943는 erythrosine의 농도가 0.625 μ M이상에서부터 통계적으로 유의하게 감소하였고($P < 0.05$), *E. faecalis* ATCC 29212는 erythrosine의 농도가 2.5 μ M이상에서부터 통계적으로 유의하게 감소하였다($P < 0.05$). 두군 모두에서 erythrosine의 농도 5 μ M 이상에서 그 이하보다 유의하게 세균의 수가 통계적으로 유의하게 감소하였다($P < 0.05$) (Table 1).

Table 1. CFU/Well ($\times 10^4$) of *E. faecalis* by erythrosine concentration after PDT

Contents	LED irradiation time (seconds)	Erythrosine concentration (μM)	CFU/Well ($\times 10^4$) (Mean \pm SD)	P-value
<i>E. faecalis</i> ATCC 1943	30	10	2.39 ± 0.82^a	<0.001
		5	3.82 ± 0.24^a	
		2.5	11.70 ± 0.66^b	
		1.25	16.51 ± 3.98^c	
		0.625	17.30 ± 0.99^c	
		0	23.82 ± 1.81^d	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	30	10	0.74 ± 0.25^a	<0.001
		5	3.25 ± 2.22^a	
		2.5	7.27 ± 0.66^b	
		1.25	9.32 ± 0.66^{bc}	
		0.625	8.81 ± 0.86^{bc}	
		0	10.71 ± 1.18^{cd}	

^{a,b,c,d}The same letter indicates no significant difference by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison at $\alpha=0.05$.

Table 2. CFU/Well ($\times 10^4$) of *E. faecalis* by LED irradiation time after PDT

Contents	LED irradiation time (seconds)	CFU/Well ($\times 10^4$) (Mean \pm SD)	P-value
<i>E. faecalis</i> ATCC 1943	0	24.44 ± 5.91^a	<0.001
	1	26.56 ± 7.22^a	
	5	22.21 ± 2.24^a	
	10	21.84 ± 3.30^a	
	15	12.20 ± 3.31^b	
	20	9.12 ± 1.29^b	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0	4.78 ± 0.53^b	<0.001
	1	7.26 ± 1.20^a	
	5	7.40 ± 1.47^a	
	10	6.36 ± 1.15^a	
	15	4.04 ± 0.46^b	
	20	2.93 ± 0.27^{bc}	
	30	2.54 ± 0.38^{bc}	
		0.89 ± 0.81^c	

^{a,b,c}The same letter indicates no significant difference by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison at $\alpha=0.05$.

2. PDT 적용 후 표준균주 별 광조사 시간에 따른 세균 수

E. faecalis ATCC 1943는 LED 조사 시간이 15초 이상일 경우 그 이하보다 더 많은 감소를 보였고($P<0.05$), *E. faecalis* ATCC 29212는 조사 시간이 10초 이상일 경우 그 이하보다 더 많은 감소를 보였다($P<0.001$) (Table 2).

고 안

치수 및 치근단 질환의 원인균들은 근관 내벽에 세균막 형태로 존재하여 병소를 유발하는데²¹, 그 중 *E. faecalis*은 변연치주염과 근관주위염의 원인균이며^{22,23}, 감염된 근관의 52.94%에서 발견되는 주요 균종으로^{24,25} 생존력이 우수한 특징을 갖고 있다⁵. 반면에 감염근관에서 완벽히 제거하기엔 가장 어려운 균주로 알려져 있다²⁶. PDT는 미생물에 대한 항균효과를 목표로 하는 새로운 대안으로, 기존의 항미생물 요법에서 보고되고 있는 세균 내성이 이 PDT에서는 발생하지 않는다는 것이 중요한 시사점이다²⁷.

PDT에는 세균에 대한 항균효과를 발휘할 수 있도록 적절한 광감작제와 광원이 필요한데, 본 연구에서는 erythrosine과 녹색 LED를 이용하였다. Erythrosine은 치면세균막 착색제로 치과에서 흔하게 사용하는 제제인데 적외선의 빛을 흡수하여 광화학적 반응을 일으킬 수 있어서 광감작제로 사용하는데에 효과적이다²⁸. LED는 치과에서 충전재료의 중합을 위해 일반적으로 사용하는 광원으로, 레이저보다 저렴하고 사용이 용이하기 때문에 레이저의 대체로서 제안되었다²⁹. 이전에 erythrosine과 LED를 이용하여 세균에 대한 PDT의 효과를 확인한 연구²⁰에서 520-530 nm 녹색 LED가 다른 파장의 LED에 비해 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*에 대한 항균효과가 우수함을 확인하였기에 이를 근거로 본 연구에서는 520-530 nm 녹색 LED를 광원으로 사용하였다. 동일한 광감작제라고 하더라도 어떤 파장의 빛이 조사되는지에 따라 그 효과가 차이가 나기 때문이다. Erythrosine에 520-530 nm 녹색 LED를 조사하면, erythrosine 광감작제는 높은 에너지를 갖는 삼중항상태(triplet -state)로 변화되며, 생체분자와 반응하여 유리기를 형성하거나 산소분자와 반응하여 일중항산소를 만들어내어 세균의 원형질과 DNA를 산화시키므로써 세균을 사멸시킨다¹³.

Erythrosine의 농도에 따른 항균효과는 *E. faecalis* ATCC 1943와 *E. faecalis* ATCC 29212에서 erythrosine을 5 μM 이상 적용하였을 때, 그 이하를 사용한 군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였으며, erythrosine의 농도가 증가할수록 CFU가 통계적으로 유의하게 감소하는 결과를 보였다(Table 1). 이는 *S. mutans*에 대해 광감작제로 erythrosine을 사용한 Jung 등³⁰의 연구에서도 동일하게 나타났는데, erythrosine의 농도가 증가할수록 항균효과가 증가하며, 5 μM 이상에서 통계학적 감소를 보임을 확인할 수 있었다.

LED 조사시간에 따른 효과에서는 *E. faecalis* ATCC 1943가 LED 조사 시간이 15 이상일 경우 그 이하보다 더 많은 세균수의 감소를 보였고($P<0.001$), *E. faecalis* ATCC 29212는 조사 시간이 10초 이상일 경우 그 이하보다 더 많은 감소를 보였다($P<0.05$)(Table 2). Metcalf 등³¹이 erythrosine을 이용하여 *S.*

*mutans*에 대한 조사시간에 따른 PDT의 효과를 확인하고자 시행한 연구에서는 광조사 5분 동안 세균의 98%까지 사멸되었고, 그 후의 세균 수의 감소 속도가 줄어드는 것으로 나타났다. 본 연구에서 사용한 광원과 조사시간 단위의 차이가 있어서 비교하는 것에는 한계가 있으나, 시간의 경과에 따라 세균 수의 감소가 둔화되는 유사한 결과를 확인하였으며, 추후 보다 다양한 단위의 조사시간에 따른 변화를 연구할 필요가 있다. Kaushik 등³²⁾은 여러 가지 근관세정액의 *E. faecalis*에 대한 항균효과를 생체외 실험실으로 생리식염수와 비교 연구하였는데, 이 중에서 효과가 높았던 제제는 5.25% NaOCl가 약 85%, 3% H₂O₂가 약 45%의 항균효과를 가진다고 보고하였다. 본 연구에서는 10 μ M의 erythrosine이 주입 하에서 빛을 조사하지 않았을 때와 비교하여 30초간 빛을 조사하였을 때 약 80-88% 항균효과를 나타내었다. 실험조건이 다르기 때문에 직접적 비교는 어렵지만 *E. faecalis*에 대한 PDT의 항균효과는 기대할 만한 수준이라고 판단된다. 그러나 본 연구에서는 세균현탁액 상태(planktonic)의 *E. faecalis*를 대상으로 실험하였으므로 이 세균이 biofilm을 형성하고 있는 상태에서의 PDT 효과에 대한 연구도 앞으로 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 *E. faecalis*에 광감작제와 광원으로 erythrosine과 녹색 LED를 이용한 유일한 연구라는 점에서 그 의미가 있다. 추후 본 연구에서 얻은 결과를 토대로, 보다 적용 가능한 erythrosine의 농도와 LED의 조사시간, 조사거리 등 적용방법에 대한 후속연구가 필요하며, 나아가 실제 치아의 근관 내에서의 항미생물 효과와 근관치료 과정에서의 적용가능성에 대한 임상시험이 진행되어야 할 것이라 생각된다.

결론

PDT는 기존의 항미생물 치료법의 대안 또는 보조적 방법으로 제시되고 있기 때문에, 이에 본 연구는 구강 내 상주균이자, 근관치료의 결과 및 관련 치주염의 원인이 되는 *E. faecalis*에 대하여 erythrosine 농도와 녹색 LED의 조사시간에 따른 PDT의 효과를 확인하고자 진행되었다. 연구결과에 따르면, LED의 조사시간이 30초 일 경우, erythrosine 농도가 5 μ M 이상에서 *E. faecalis* 수가 통계적으로 유의하게 감소하였으며($P<0.05$), erythrosine 농도가 10 μ M 일 경우, LED의 조사시간이 10-15초 이상에서 *E. faecalis* 수가 통계적으로 유의하게 감소하였다($P<0.05$). 이상의 연구결과를 통해 erythrosine과 녹색 LED를 이용한 PDT가 *E. faecalis*에 대한 항균 효과가 있음을 확인하였으며, erythrosine의 농도증가와 LED 조사시간 증가에 따라 항균효과도 증가하였다. 추후 효과적인 PDT 적용 방법과 구강 내에서의 실용가능성에 대한 후속 연구가 필요할 것이다.

References

1. Moore WEG, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:66-77.
2. Socarranck SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease. *J Periodontol* 1992;63:322-331.
3. Kornman KS, Löe H. The role of local factors in the etiology of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1993;2:83-97.
4. Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent SM, Bischoff T, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:686-691.
5. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:234-239.
6. Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Auffray Y. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:812-814.
7. Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 2008;34:926-931.
8. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981;89:321-328.
9. Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982;54:323-328.
10. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985;1:170-175.
11. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35:221-228.
12. Huh SY, Rhim EM, Kim SY, Park SH. Laser in Endodontics. *The Journal of Korean Dental Association* 2011;49:660-669.
13. Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins-an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B* 1990;5:281-293.
14. Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:932-940.
15. Paulino TP, Ribeiro KF, Theidei G Jr, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2005;50:353-359.
16. Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 2007;39:782-787.
17. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 2006;32:979-984.
18. Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod* 2011;37:856-859.
19. Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol* 2011;15:323-327.
20. Lee SY, Chang BS, Um HS, Ma DS. Comparison of photodynamic bactericidal effects of erythrosine against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* by different wavelength of LED Lights. *J Korean Acad Oral Health* 2012;36:20-25.
21. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992;8:427-430.
22. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC,

- Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-76.
23. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-320.
 24. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34:429-434.
 25. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1-11.
 26. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(1):86-93.
 27. Courvalin P. The Garrod Lecture. Evasion of antibiotic action by bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:855-869.
 28. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:680-684.
 29. Zanin IC, Gonçalves RB, Brugnara A Jr, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:324-330.
 30. Jung JS, Park HW, Lee JH, Seo HW, Lee SY. The effect of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* isolated from oral cavity. *J Korean Acad Pediatr Dent* 2012;39:233-241.
 31. Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:190-192.
 32. Kaushik N, Rehani U, Agarwal A, Kaushik M, Adlakha V. Antimicrobial Efficacy of Endodontic Irrigants against *Enterococcus Faecalis* and *Escherichia Coli*: An in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2013;6:178-182.