

## SDS-PAGE를 이용한 *Prevotella intermedia*와 *P. nigrescens*의 감별에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실

배광식

Abstract

### DIFFERENTIATION OF *PREVOTELLA INTERMEDIA* AND *P. NIGRESCENS* USING SDS-PAGE

kwang-Shik Bae, D.D.S., M.S.D., Ph. D.,

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

In 1992, *Prevotella intermedia* was shown to be comprised of another species now known as *Prevotella nigrescens*. Strain ATCC 33563 is now designated the type strain of *P. nigrescens* while strain ATCC 25611 remains the type strain of *P. intermedia*.

The purpose of this study was to find the differences in protein profiles of *P. intermedia* and *P. nigrescens*, using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, which can be used for differentiation of those two species. A partial amino acid sequence of the 18.6 kDa protein band, which was specific in *P. nigrescens*, was also determined.

The cellular proteins were extracted from the cell pellets of pure cultures of *P. intermedia* and *P. nigrescens* by either sonication or being shaken continuously for 20 min at 21°C with 1% SDS or being boiled for 3 min with 1% SDS. SDS-PAGE was performed according to the method of Laemmli<sup>15)</sup> using either 12% (w/v) gels or 18% (w/v) gels.

Results were as follows :

1. The similar electrophoretic protein profiles were shown by 3 cellular protein extraction methods for each strain.(Fig. 1 and 2)
2. the 18.6 kDa band which was specific only in *P. nigrescens* could be used for the differentiation of *P. intermedia* and *P. nigrescens*.(Fig. 1 and 2, Table 1)
3. A total of 4 different tryptic fragments from the 18.6 kDa protein were sequenced. the resulting amino acid sequences were fragment 1.GNPVNIGGEW, 2.FNVVR, 3.NYLT-

\* 이 논문은 1992년도 서울대학교 병원 임상연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

VAPY, and 4.GGDNVTTYQVLPEIGYN. By comparison to the sequences of known proteins in the Swiss-Prot database and PIR database. 90% matching between fragment 1 and serine hydroxymethyl transferase(P24060) in the Swiss-Prot, and 90% matching between fragment 1 and glycine hydroxymethyl transferase(S15203) in the PIR were shown, but the identity and function of the 18.6 kDa protein remains unknown.

## I. 서 론

Sundqvist 등<sup>27)</sup>은 치근단 주위염을 가진 72개의 치아에서 22개(30%)의 근관이 1개 이상의 흑색균을 포함했으며, *Bacteroides intermedius* 14주(strain), *B. endodontalis* 5주, *B. gingivalis* 2주, *B. loescheii* 3주, *B. denticola* 1주가 분리 동정되었고, 흑색균을 포함한 22개 근관중 16개의 근관에서 급성 치근단 농양과 화농성 배농이 발견되었다고 보고하는 등, *Prevotella intermedia*와 근관감염 사이에 밀접한 관련이 있다는 많은 연구보고가 있었다.<sup>3, 5, 7-9, 13, 18, 25, 27, 28, 32-37)</sup>

1992년에 Shah 등<sup>23)</sup>은 *Prevotella intermedia* 균주들을 Multilocus 효소 전기영동(enzyme electrophoresis)한 결과 두가지 다른 형태의 전기영동 프로파일(profile)을 보이며, 하나는 ATCC25611<sup>†</sup>와 같고, 다른 하나는 ATCC33563<sup>†</sup>와 같은 것을 발견하여 ATCC33563<sup>†</sup>와 hybridize되는 유전적인 특징을 가진 균주들을 *Prevotella nigrescens*라고 명명하였다.

bacteroides subgroup은 세균의 10문(phylum) 중 cytophaga-flavobacter-bacteroides (CFB)문의 5개의 subgroup (cytophaga, flavobacter, sphingobacter, saprospira, bacteroides) 중 하나이다.<sup>17)</sup>이 bacteroides subgroup은 Shah와 Collins<sup>20-22)</sup>에 의해 탄수화물분해능이 없는 (i) *Porphyromonas* 속- *P. gingivalis*(1980), *P. asaccharolytica* 및 *P. endodontalis*(1984), (ii) *Bacteroides sensu stricto* 속- 탄수화물분해능이 있는 비흑색균, *B. fragilis* 등, (iii) *Prevotella* 속- 중등도의 탄수화물 분해능과 bile-sensitive인 *P. melaninogenica*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*(1992), *P. bivia*, *P. buccae*, *P. corporis*,

*P. denticola*, *P. Loescheii*, *P. oralis*, *P. veroralis*, 등의 3개 속으로 재편되었다.

*Prevotella* 속 중 많은 종과 모든 *Porphyromonas* 속의 종들은 protoporphyrine이나 protoheme이라는 흑색 또는 갈색소를 포함하고 있다.

본 연구의 목적은 임상증상을 수반한 감염 근관에서 제일 많이 발견되는 *P. intermedia*가 최근 *P. nigrescens*라는 신종균과 *P. intermedia*로 재분류되었으나 통상의 방법으로는 두 세균을 감별할 수 없으므로, 두 세균의 전세포 단백질(whole cell protein)의 전기영동 단백질형(electrophoretic protein profile)의 차이에 의한 감별가능성을 살피고, *P. nigrescens*의 단백질형(protein profile)에서 특징적인 부분의 protein sequencing을 행하는 것이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 사용균주 및 배양

*Prevotella intermedia*의 표준균주(type culture)인 ATCC 25611과 *Prevotella nigrescens*의 표준균주(type culture)인 ATCC 33563을 혐기조건하에서, 메나디온(menadione) 10mg/L과 헤민(hemin) 5mg/L를 첨가한 콜롬비아 토혈한천배지(Columbia rabbit blood agar)에 접종하여 2-3일 후 콜로니(colony)가 흑색으로 변할 때까지 배양하였다. 혐기조건을 충족시키기 위하여 85% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 및 10% H<sub>2</sub>를 지닌 37°C의 혐기성 세균배양기(Anaerobic chamber; Bactron II Anaerobic Chamber, Sheldon manufacturing Inc. Cornelius, OR, USA)에서 배양하였다.

## 2. 배양균의 수확

배양된 세균을 백금 루프를 이용해 수확해서 10ml PBS(phosphate buffered saline ; pH 7.0)에 현탁한 후, 원심분리기(IEC Model HN-SII, International Equipment Co. Needham heights, MA, USA)를 이용해 1,000xg에서 10분 동안 원심분리하여 세균침전물(cell pellet)을 얻고, 배양배지 및 미생물 생산물을 완전히 제거하기 위하여 10ml PBS에 현탁 및 원심분리하는 과정을 두 번 더하여 세척하였다.

## 3. SDS-PAGE

세균의 용해 단백질을 얻기 위하여 세가지 방법을 사용하였는데, 첫째 세균침전물에 200 ml의 증류수를 첨가해 30초간 초음파분쇄(sonication)한 균, 둘째 세균을 용해시키기 위하여 200 $\mu$ l의 1% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 각 세균침전물에 첨가한 현탁액을 Shaker (Lab-Line Incubator-Shaker, Lab-Line instruments, Inc., Melrose park, IL, USA)에서 20분간 21 $^{\circ}$ C에서 셰이킹한 균, 셋째 세균을 용해시키기 위하여 200 $\mu$ l의 1% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 각 세균침전물에 첨가한 현탁액을 3분간 끓인(boiling) 균으로, 각각을 원심분리기(Model J2-HS Centrifuge, Beckman Instrument, Inc. Fullerton, CA)에서 10,000xg로 5분간 원심분리하여 용해된 세균단백질을 포함한 상층액을 얻었다.

이렇게 얻은 상층액을 BCA protein Assay Reagent(Pierce, rockford, IL, USA)를 이용해 정량한 후 12% (w/v) minigel 또는 18% (w/v) minigel(Novex, San Diego, CA, USA)을 이용해 Laemmli의 방법<sup>15)</sup>으로 SDS-PAGE를 수행하였다. 이때 첫 번째 lane에는 SDS-PAGE Molecular Weight Standards(Bio-Rad Labora-

tories, Hercules, CA) 10 $\mu$ g의 단백질을, 기타 lane에는 각 샘플의 용해세균단백질을 15 $\mu$ g씩 사용하였으며, Xcell II electrophoresis apparatus(Novex, San Diego, CA, USA)에서 125V로 12% (w/v) gel 인 경우는 2시간, 18% (w/v) gel인 경우는 2시간 30분동안 전기영동을 수행하였다.

전기영동한 gel을 Coomassie Blue-R250(40% Methanol, 10% Acetic acid, 0.1% Coomassie Blue-R250) 으로 5시간 또는 밤새 염색한 후, 탈색용액(40% Methanol, 10% Acetic acid)으로 탈색하였으며, 7% acetic acid로 고정한 후 Novex Gel Drying System(Novex, San Diego, CA, USA)으로 건조시켰다.

폴리펩타이드 밴드(polypeptide band)의 이미지(imae)는 Gel Doc 1000 Camera와 Molecular Analyst software(BioRad, Hercules, CA, USA)를 이용해 digitization해서 molecular weight standard와 비교하여 molecular weight를 비교하였다. *P. nigrescens*의 특징적인 폴리펩타이드 밴드(polypeptide band)의 크기를 정확히 계산하기 위하여 22개의 gel의 22개의 *P. nigrescens*의 폴리펩타이드 밴드의 평균치를 구했다.(Table 1)

## 4. Protein sequencing

특징적인 *P. nigrescens*의 단백질의 동정 및 가능한 기능을 실행하기 위하여, 18.6 kDa 단백질을 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane (Immobilon P, Millipore Corp., Bedford, MA, USA)으로 blot transfer하였다. 흡착단백질은 0.1% Ponceau S와 1% acetic acid에서 염색한 후, MilliQ water(Millipore Corp.)로 background stain을 제거하였다. 18.6 kDa의 폴리펩타이드를 잘라낸 후 pH11의 MaOH 용

Table 1. Mean MW(kDa) of the specific band of *Prevotella nigrescens*

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
kDa	19.1	17.7	18.7	16.8	19.7	18.6	18.0	18.6	19.7	20.6	17.0			
No.	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	sum	mean	S.D.
kDa	17.8	16.8	16.0	17.0	16.7	18.8	19.7	19.8	20.9	20.0	20.1	408.1	18.6	1.4

액으로 탈색한 후 MilliQ water로 세척하여 -20 °C에 보관하였다. 막표면으로부터 트립신(trypsin)으로 펩타이드를 분해시키고, 이렇게 얻은 펩타이드 조각을 chromatography에 의해 분리한 후 수종의 펩타이드를 David<sup>2)</sup>의 방법에 따라 Model 470A Protein/Peptide Sequencer와 120A PTH Amino Acid Analyzer(Applyed Biosystems, Foster City, CA, USA)로 sequencing 하였다.

### III. 실험결과

*Prevotella intermedia*의 표준균주(ATCC 25611)과 *Prevotella nigrescens*의 표준균주(ATCC 33563)의 전단백질을 전기영동한 결과 초음파

분쇄(sonication)한 균, 1% SDS를 첨가해 20분간 21°C에서 셰이킹한 균, 1% SDS를 첨가해 3분간 끓인(boiling) 균 모두가 유사한 폴리펩타이드 형(pattern)을 보였다. 또한 Molecular weight standard 14.4kDa와 21.5 kDa 사이에 *Prevotella intermedia*와 *Prevotella nigrescens*를 감별할 수 있는 특징적인 밴드(Band)가 나타난바 22개의 *Prevotella nigrescens*의 밴드를 계산 평균낸 결과 18.6 kDa임을 확인할 수 있었다. (Fig.1 과 2, Table 1)

*Prevotella nigrescens*의 18.6 kDa 밴드의 4개의 tryptic fragment를 Protein sequencing한 결과 1.GNPVNIGGEW, 2.FNVVVR, 3.NYLT-VAPY, 4.GGDNVTTYQVLPEIGYN의 아미노산 시퀀스를 얻었다.

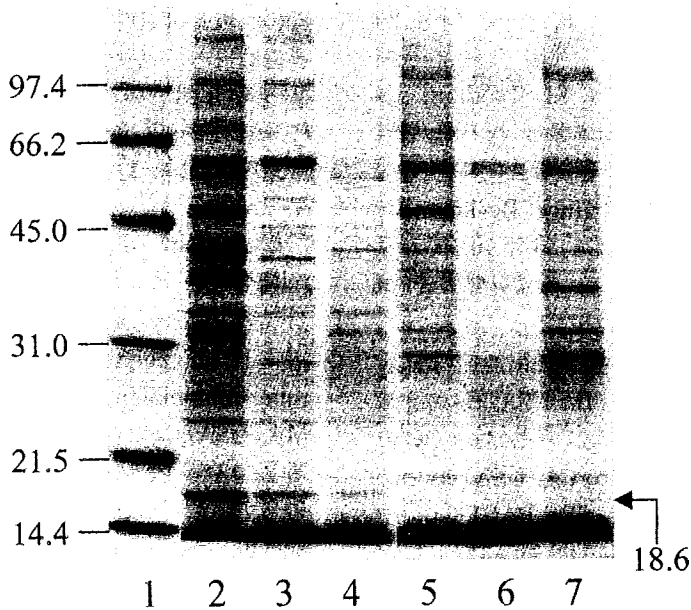


Fig. 1. SDS-PAGE separation of proteins from *P. nigrescens*(ATCC 33563) and *P. intermedia* (ATCC 25611) using 12% gel. Lane 1 : molecular weight standards. Lane 2,3,4 : *P. nigrescens* of sonicated, shaken with 1% SDS, or boiled with 1% SDS sample respectively, note the presence of an 18.6 kDa band(arrow). Lane 5,6,7 : *P. intermedia* of sonicated, shaken, or boiled sample respectively, note the presence of a band a little larger than 18.6 kDa.

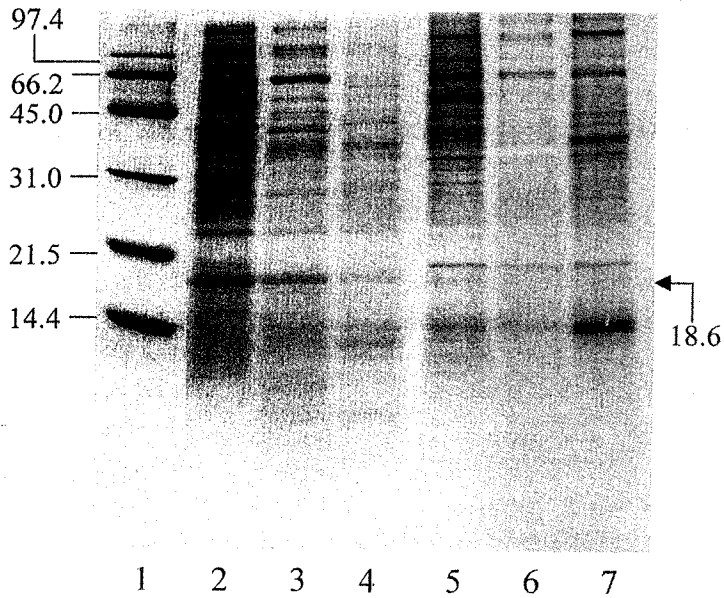


Fig. 2. SDS-PAGE separation of proteins from *P. nigrescens*(ATCC 33563) and *P. intermedia* (ATCC 25611) using 18% gel. Lane 1 : molecular weight standards. Lane 2.,3,4 : *P. nigrescens* of sonicated, shaken with 1% SDS, or boiled with 1% SDS sample respectively, note the presence of an 18.6 kDa band(arrow). Lane 5,6,7 : *P. intermedia* of sonicated, shaken, or boiled sample respectively, note the presence of a band a little larger than 18.6 kDa.

#### IV. 총괄 및 고안

세균의 동정은 전통적으로 생화학 검사(biochemical test)나 생리학 검사(physiological test)를 통해 이루어져 왔다. 세균학에서 사용되어 온 많은 생리적 검사는 특정 효소의 존재 여부를 밝히는 것이었고, 또한 세균의 효소활성의 측정도 세균분류에 많이 사용되었다. 그러나 이러한 방법으로 동정이 안되는 경우는 새로운 방법들이 고려되어야 한다.<sup>1, 10, 16, 19, 23, 29, 38)</sup> 효소가 어떤 세균군의 모든 균주에 공통으로 존재한다면, 이의 활성은 더 이상 분류의 기준이 되지 못하나, 이의 분자 특성(molecular property)은 분류에 사용될 만큼 서로 다를 수 있다. 쉬운 예로 동일한 효소의 세균 균주간의 전기영동 이동성(electrophoretic mobility)의 차이를 사용하는 방법 등이 그것이다.<sup>23)</sup> Shah 등<sup>19)</sup>은 MDH(malate dehydrogenase)나 GDH(gluta-

mate dehydrogenase)의 효소 전기영동법으로 세균의 동정을 시도하였다.

본 실험에서는 MDH나 GDH 대신 전세포 단백질 추출액(whole cellular protein extract)을 사용하였는데, 단백질의 추출은 초음파분쇄(sonication)법, 1% SDS를 첨가해 20분간 21°C에서 웨이킹하는 법, 1% SDS를 첨가해 3분간 끓이는(boiling)법 등의 세가지 방법을 사용하였다.

Gharbia 등<sup>5)</sup>에 의하면 1% SDS를 첨가해 추출한 단백질을 SDS-PAGE한 경우 세포단백형(cell protein profile)에서 *Prevotella nigrescens*에만 특징적인 31 kDa 단백질 밴드가 나타난다고 보고하였으나, 본실험에서는 이를 재현할 수 없었고, 그들로부터 그들의 보고가 오류였다는 회신을 받았다. 본 실험에서는 *Prevotella nigrescens*에만 특징적인 18.6 kDa 단백질 밴드를 발견하고, 이의 protein sequencing까지

시행하였다. Gharbia 등( )은 10% gel을 사용하였는데 10% gel의 수행범위(performance range)는 30-200 kDa로서, 30 kDa보다 작거나 30 kDa 언저리의 폴리펩타이드 밴드는 분리되지 않고 모두 바닥(bottom)에 모여 있게 되므로, 10% gel을 사용한 경우 31 kDa 밴드는 구분하기 어렵다. Teanpaison 등<sup>30)</sup>은 *Prevotella intermedia*와 *Prevotella nigrescens*의 감별을 위해 12% gel을 사용해 SDS-PAGE를 행한 결과, *Prevotella intermedia*는 18.7 kDa의 특징적인 밴드를 가지고, 32 kDa 밴드가 있는 경우와 없는 경우가 있었으며, *Prevotella nigrescens*는 17.2 kDa 및 32 kDa 밴드를 특징적으로 보인다고 보고하였다. 그들의 SDS-PAGE pattern의 사진에서 그들의 단백질 밴드는 본실험에서 보인 것과 유사하나, 단백질분자량 계산에서 본실험과 차이를 보이는데, 이는 본실험에서 분자량 표준으로 14.4 kDa와 21.5 kDa를 사용한 반면, 그들은 가장 낮은 분자량 표준이 29 kDa이므로, 본실험의 분자량 계산이 보다 정확할 것으로 사료된다. 본실험에서는 22개의 gel을 사용해 분자량 계산을 한 결과 18.6±1.4 kDa의 수치를 얻었다.

*Prevotella nigrescens*의 18.6 kDa 밴드의 protein sequencing 결과, 1.GNPVNIGGEW, 2.FN-VVR, 3.NYLTVAPY, 4.GGDNVTTYQVLPEIGYN의 아미노산 서퀀스를 얻었는데, 저자가 아는 한 GeneBank에 *Prevotella nigrescens*의 16 s rDNA sequence 외에는 아직 *Prevotella nigrescens*의 분자생물학적 자료가 없는 것으로 알고 있으며, GeneBank에서 동일한 sequence는 찾을 수가 없었고, 1.GNPVNIGGEW는 Swiss-prot의 Serine hydroxymethyl transferase(P24060)과 90%의 matching을 보였고, PIR에서 Glycine hydroxymethyl transferase(S15203)와 90%의 matching을 보였다.

Killian<sup>14)</sup>은 *Bacteroides asaccharolyticus*와 *B. melaninogenicus subsp. intermedius*가 IgA1과 polyclonal IgG의 완전파괴의 원인이라고 보고하였고, 또한 Jansen 등<sup>11,12)</sup>은 *Prevotella intermedia*와 *Prevotella nigrescens*가 IgG를 비특이적으로 파괴하는 다양한 단백질분해효소를 가진

다고 보고하는 등 많은 학자들이 흑색세균에 의한 immunoglobulin의 파괴 또는 단백질분해효소에 관하여 연구보고한 바 있다.<sup>4,6,11,12,14,24,26,31)</sup>

앞으로 *Prevotella nigrescens*의 단백질에 관한 많은 연구가 행해져야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구의 목적은 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 통상의 방법으로는 감별할 수 없으므로, 두 세균의 전세포 단백질(whole cell protein)의 전기영동 단백질형(electrophoretic protein profile)의 차이에 의한 감별가능성을 살피고, *P. nigrescens*의 단백질형(protein profile)에서 특징적인 부분의 protein sequencing을 행하는 것으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 본 실험에서는 단백질 추출법으로, 초음파 분쇄(sonication)법, 1% SDS를 첨가해 20분간 21°C에서 웨이킹하는 법, 1% SDS를 첨가해 3분간 끓이는(boiling)법 등의 세가지 방법을 사용하였는데 전기영동시 모두 유사한 단백질 pattern을 보였다.
2. *P. nigrescens*에만 특징적으로 나타나는 18.6 kDa 밴드로 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 감별할 수 있을 것으로 사료된다.
3. *Prevotella nigrescens*의 18.6 kDa 밴드의 protein sequencing 결과, 1.GNPVNIGGEW, 2.FNVVR, 3.NYLTVAPY, 4.GGDNVTTYQVLPEIGYN의 아미노산 서퀀스를 얻었는데, 1.GNPVNIGGEW는 Swiss-Prot의 Serine hydroxymethyl transferase(P24060)과 90%의 matching을 보였고, PIR에서 Glycine hydroxymethyl transferase(S15203)와 90%의 matching을 보였으나, 동정과 기능은 알 수 없었다.

## REFERENCES

1. Dahlén G, Wickström M, Renvert S, Gm r R, Guggenheim B. Biochemical and serological characterization of *Bacteroides intermedius* strains isolated from the deep periodontal pocket. J Clin Microbiol 19

- 90 ; 28(10) : 2269–2274.
2. David LL, Shearer TR.  $\beta$ -Crystallins insolubilized by calpain II in vitro contain cleavage sites similar to  $\beta$ -crystallins insolubilized during cataract. *FEBS Lett.* 1993 ; 324(3) : 265–270.
  3. Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endod Dent Traumatol* 1995 ; 11 : 142–149.
  4. Frandsen EVG, Reinholdt J, Kilian M. Immunoglobulin A1(IgA1) proteases from prevotella(*Bacteroides*) and *Capnocytophaga* species in relation to periodontal diseases. *J Periodont Res* 1991 ; 26 : 297–299.
  5. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN, et al. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol* 1994 ; 65(1) : 56–61.
  6. Grenier D, Mayrand D, McBride BC. Further studies on the degradation of immunoglobulins by black-pigmented *Bacteroides*. *Oral Microbiol Immunol* 1989 ; 4 : 12–18.
  7. Griffie MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH, Newton CW. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg* 1980 ; 50 : 457–461.
  8. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infect Immun* 1986 ; 53 : 149–153.
  9. Haapasalo M. Black-pigmented Gram-negative anaerobes in endodontic infections. *Immunology and Medical Microbiology* 1993 ; 6 : 213–217.
  10. Hitchcock PJ, Brown TM. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* 1983 ; 154(1) : 269–277.
  11. Jansen H-J, Van der Hoeven JS, van den Kieboom CWA, Göertz JHC, Camp PJM, Bakkeren JAJM. degradation of immunoglobulin G by periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1994 ; 9 : 345–351.
  12. Jansen H-J, Grenier D, Van der Hoeven JS. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 1995 ; 10 : 138–145.
  13. Johnson JL, Holdeman LV. *Bacteroides intermedius* comb. nov. and descriptions of *Bacteroides corporis* and *Bacteroides levii* sp. nov. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 1983 ; 33 : 15–25.
  14. Kilian M. Degredation of immunoglobulin A1, A2, and G by suspected principal periodontal pathogens. *Infect Immun* 1981 ; 34 : 757.
  15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970 ; 227 : 680–685.
  16. Moncla BJ, Strockbine L, Braham P, Karlinsky J, Roberts MC. The use of whole-cell DNA probes for the Identification of *Bacteroides intermedius* isolates in a dot blot assay. *J Dent Res* 1988 ; 67(10) : 1267–1270.
  17. Paster BJ, Dewhirst FE, Olsen I, Fraser GJ. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. *J Bacteriology* 1994 ; 176(3) : 725–732.
  18. Shah HN, Williams RAD, Bowden GH, Hardie JM. Comparison of the biochemical properties of *Bacteroides melaninogenicus* from human dental plaque and other sites. *J Appl Bacteriol* 1976 ; 41 : 473–492.
  19. Shah HN, Williams RAD. Dehydrogenase

- patterns in the taxonomy of *Bacteroides*. *J Gen. Microbiol.* 1982 ; 128 : 2955–2965.
20. Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol* 1988 ; 38 : 128–131.
  21. Shah HN, Collins MD. Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. *Int J Syst Bacteriol* 1989 ; 39 : 85–87.
  22. Shah HN, Collins DM. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol* 1990 ; 40 : 205–208.
  23. Shah HN, Gharbia SE. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1992 ; 42 (4) : 542–546.
  24. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res* 1984 ; 63 : 412–421.
  25. Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson ÅP, Sjögren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun* 1979 ; 25 : 685–693.
  26. Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B, Tärnvik A. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *J Med Microbiol* 1985 ; 19 : 85–94.
  27. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endodon* 1989 ; 15 : 13–19.
  28. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *Journ of Endo* 1992 ; 18(9) : 427–430.
  29. Swindlehurst CA, Shah HN, Parr CW, Williams RAD. Short communication : Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of polypeptides from *Bacteroides melaninogenicus*. *J of Applied Bacteriology* 1977 ; 43 : 319–324.
  30. Teanpaisan R, Douglas CWI, Walsh TF. Characterisation of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. *J Periodont Res* 1995 ; 30 : 245–51.
  31. ter Steeg PF, van der Hoeven JS, de Jong MH, van Munster PJJ, Jansen MJH. Enrichment of subgingival microflora on human serum leading to accumulation of *Bacteroides* species, *Peptostreptococci* and *Fusobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1987 ; 53 : 261–271.
  32. van Steenberg TJM, Kastelein P, Touw JJA, De Graaff J. Virulence of black-pigmented *Bacteroides* strains from periodontal pockets and other sites in experimentally induced skin lesions in mice. *J Periodontol Res* 1982 ; 17 : 41–49.
  33. van Steenberg TJM, van Winkelhoff AJ, van der Velden U, de Graaff J. Taxonomy, virulence and epidemiology of black-pigmented *Bacteroides* species in relation to oral infections. *Infect* 1989 ; 17 : 82–84.
  34. van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect Immun* 1985 ; 49 : 494–497.
  35. van Winkelhoff AJ, Kippuw N, de Graaff



- J. Cross-inhibition between black-pigmented *Bacteroides* species. *J Dent Res* 1987 ; 66 : 1663–1667.
36. Wasfy MO, McMahon KT, Minah GE, Falker WAJ. Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiol Immunol* 1992 ; 7 : 100–105.
37. Weiger R, Manncke B, Werner H, Lost C. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. *Endodon Dent Traumatol* 1995 ; 11(1) : 15–19.
38. Wu CC, Johnson JL, Moore WEC, Moore LVH. Emended descriptions of *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella verolis*, and *Prevotella melaninogenica*. *Int. J. Syst. Bact.* 1992 ; 42(4) : 536–541.