

치태형성 억제세균과 구강내 세균수와의 관계

양규호 · 정현주* · 오종석**

전남대학교 치과대학 소아치과학교실 및 치주과학교실*, 의과대학 미생물학교실**

국문초록

소아의 구강으로부터 분리한 비수용성 글루캔 형성 억제세균의 *Streptococcus mutans* 치태 형성에 대한 억제 정도와 분리 세균속의 타액내 농도가 타액내 전체 세균의 농도에 미치는 영향을 본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

구강으로부터 분리한 비수용성 글루캔 형성 억제세균의 효과를 미커 와이어 검사로 본 결과, 교정용 와이어상에 형성된 치태의 무게가 *Streptococcus mutans* 단독배양시 152mg에서 *Enterococcus durans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*와의 혼합배양시 각각 4mg, 78mg, 72mg으로 감소되었다. *Streptococcus mutans*의 생균수는 단독배양시 ml당 3.6×10^8 개에서 *Enterococcus durans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*와의 혼합배양시 각각 ml당 1.4×10^6 , 5.6×10^6 , 3.8×10^6 으로 감소하였다. 소아로부터 얻은 타액을 BHI agar에 접종하였을 때의 생균수는 4.8×10^6 에서 1.3×10^9 이었으나, 이러한 전체 세균의 농도는 타액내 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans*를 억제하는 *Streptococcus*의 농도와 관련이 없었다.

이상의 결과를 종합하면 소아의 구강으로부터 분리한 비수용성 글루캔 형성 억제 세균의 *Streptococcus mutans* 치태형성에 대한 억제는 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제하여 일어났으며, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans*를 억제하는 *Streptococcus*의 구강내 농도는 구강 즉 타액내 전체 세균의 농도에 영향을 미치지 않았다.

주요어 : 치태, *Streptococcus mutans*

I. 서 론

치태는 세균과 비세포성 물질로 구성되어 있으며^{1,2)}, 비세포성 물질 중에서도 세포외 다당류인 글루캔(glucan)은 구강내 연쇄상구균, 특히 *Streptococcus mutans*의 glucosyltransferase에 의해 자당으로부터 합성되어 치아 평활면의 세균 부착 및 응괴와 치

태 형성에 관여한다. 또한 형성된 치태의 기질로 작용하는데 여기에 세균이 부착, 증식하여 산을 생성함으로써 치아우식증이 유발된다³⁻⁵⁾.

글루캔은 포도당 복합체로서 α -1,6 결합이 주된 결합인 수용성인 글루캔과 α -1,3 결합이 주된 결합인 비수용성인 글루캔, 즉 뮤tan(mutan)으로 구분된다. Guggenheim 등⁶⁾은 독력인자로 작용하는 치태의

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비 (기초의학 BM 97-L14)에 의하여 연구되었음

주요 글루캔 성분은 α -1,3으로 결합된 비수용성 뮤坦이며, dextranase (α -1,6-glucan hydrolase, EC 3.2.1.11)는 뮤坦에 대한 특이성을 갖지 못한다고 보고하였다. Ebisu 등⁷은 뮤坦의 생합성을 억제하거나 분해하는 것이 치태를 조절하는 효과적인 방법이라고 보고하였고, 비수용성 뮤坦을 분해하기 위한 mutanase (endo-1,3- α -D-glucanase, EC 3.2.1.59)를 분비하는 세균의 분리 및 효소의 정제에 대한 연구가 시도되었다^{8,9)}. 그러나 형성된 치태는 글루캔을 기본으로 하지만 여기에는 여러 다른 물질이 섞이게 되고 많은 종류의 세균들이 증식하게 되어 글루캔을 분해하는 효소로는 형성된 치태를 분해하기에 어렵게 생각되어, 이미 형성된 글루캔을 dextranase와 mutanase와 같은 효소로 분해하는 방법⁸⁻¹¹⁾보다 글루캔의 형성을 억제하는 방법이 더 효과적일 것으로 사료되었다. 수십년을 살아가는 사람의 구강에서 *Streptococcus mutans*에 의하여 치태의 형성만이 계속 이루어진다면 균형을 이루고자 하는 자연의 법칙에 어긋날 것이다. 따라서 *Streptococcus mutans*에 의하여 이루어지는 글루캔 형성을 억제할 수 있는 다른 세균이 존재할 가능성을 생각해 볼 수 있다.

사람의 구강으로부터 *Streptococcus mutans*에 의한 글루캔 형성을 억제하는 세균으로 *Enterococcus durans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*를 분리하였는데, 세균주 모두 구강내에 정상적으로 존재하는 세균이다. 이러한 글루캔 형성 억제 세균이 *Streptococcus mutans*에 의한 글루캔 형성을 억제한다면 글루캔이 기질로서 역할을 하는 치태가 감소할 것이고 따라서 구강내 세균의 숫자가 감소하리라 생각된다. 따라서 치태량이 증가함에 따라 타액내의 세균 숫자도 증가할 것인가도 규명되어야 할 것이다. 이와 같은 관계가 성립된다면 구강내 글루캔 형성을 억제하는 세균의 농도가 높을 때 치태량이 적어질 것이고, 구강내 즉 타액내 세균의 농도도 감소하리라 가정할 수 있다. 결국 구강내 글루캔 형성 억제 세균의 유무와 구강내 세균 농도와의 관계를 밝혀야 할 필요성이 있다.

본 연구에서는 글루캔 형성을 억제한다는 *Enterococcus durans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*의 치태형성 억제 정도를 비커 와이어 검사로 보았으며, 소아로부터 얻은 타액을 글루캔 형성 억제와 관련이 있는 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*

*mutans*를 억제하는 *Streptococcus*의 선택배지에 각각 접종하여 이들 세균의 농도와 구강 즉 타액내 전체 세균 농도와의 관계를 관찰하고자 하였다

II. 재료 및 방법

1. *Streptococcus mutans*에 의한 치태 형성과 증식에 미치는 분리세균의 영향

0.5% 효모 추출물 (yeast extract)과 5% 자당 (sucrose)을 첨가한 brain heart infusion broth (BHI broth, Difco, Detroit, MI, USA)에 0.1 M TES buffer (N-tris(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 비커에 40ml씩 준비하였다. 2×10^8 개의 *Enterococcus durans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*를 각각 *Streptococcus mutans*와 접종하고 대조군으로 *Streptococcus mutans*만 접종하였다. 치태의 무게를 측정하기 위하여 0.016 inch stainless steel 재질의 교정용 wire (Ormco, Glendora, CA, USA)를 3개씩 비커에 매달아 배지에 잠기도록 하였다. 37°C 탄산가스 배양기에서 흔들면서 15 시간 배양한 후 (Fig. 1), 3 개의 wire상에 형성된 인공 치태의 무게를 측정하여 평균을 구하였다. 접종된 세균의 생균수 산정을 위해 세균배양액을 회석하여 brain heart infusion agar (BHI agar, Difco, Detroit, MI, USA) 상에 접종하여 37°C 탄산가스 배양기에서 18 시간 배양한 후, 생균수를 산정하였다.

2. 타액내 세균의 배양

110명의 소아로부터 타액을 채취하여 구강내 세균의 농도를 알아보기 위하여 타액을 식염수로 10^3 , 10^4 , 10^5 배로 회석하여 0.1ml씩 BHI agar에 접종하였다. 이를 37°C 탄산가스 배양기에서 48 시간 배양한 후 접착수를 계수하여 생균수를 산정하였다. 타액내 *Enterococcus*를 증식시키기 위하여 6.5% NaCl이 함유된 BHI agar에 타액을 접종하고, *Lactobacillus*를 증식시키기 위하여 MRS agar (Difco, Detroit, MI, USA)에 타액을 접종하여 37°C에서 48 시간 배양하였다. 78명의 소아로부터 타액을 채취하여 구강내 세균의 농도를 위와 같은 방법으로 검사하였고,

*Streptococcus oralis*와 같은 투명대를 형성하는 *Streptococcus*를 증식시키기 위해서 0.5% 효모 추출물과 5% 자당을 첨가한 BHI agar에 18 시간 배양한 *Streptococcus mutans* 배양액 0.5ml를 넣어 건조시킨 다음, 타액을 100배 회석한 회석액을 넣어 건조시킨 후 37°C에서 48 시간 배양하여 주위에 *Streptococcus mutans*의 증식이 되지 않은 투명대를 형성한 집락을 계수하였다.

III. 성 적

1. *Streptococcus mutans*에 의한 치태 형성과 증식에 미치는 분리세균의 영향

교정용 와이어 상에 형성된 치태의 무게는 *Streptococcus mutans* 단독배양시 152mg에서 *Streptococcus mutans*와 *Enterococcus durans* 혼합배양시 4mg으로, *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus acidophilus* 혼합배양시 78mg으로 (Fig. 1), *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus oralis* 혼합배양시 72mg으로 감소되었다 (Tabel. 1). *Streptococcus mutans*의 생균수는 단독배양시 ml당 3.6×10^8 개에서 *Enterococcus durans* 와의 혼합배양시 ml당 1.4×10^6 으로, *Lactobacillus acidophilus*와의 혼합배양시 ml당 5.6×10^6 으로,

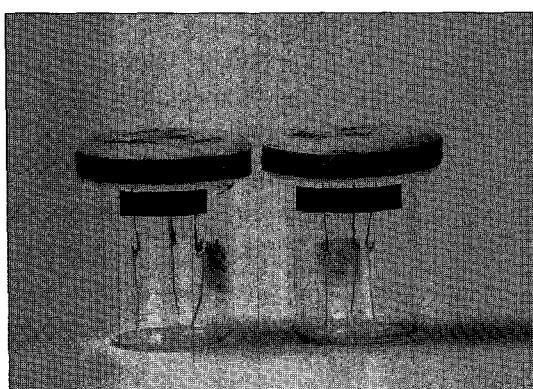


Fig. 1. Artificial plaque-coated orthodontic wires in the media of beaker. The 0.016 inch stainless steel wires with the weight of about 50 mg were incubated in the media of beaker for 15 hrs. The wires of beaker inoculated with *Streptococcus mutans* (Left) were coated with plaque more than those of beaker inoculated with *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* (Right).

Streptococcus oralis 와의 혼합배양시 ml당 3.8×10^6 으로 감소하였으나, 혼합배양시 *Enterococcus durans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*의 숫자는 단독배양시와 비슷하였다 (Tabel. 2).

2. 타액내 세균의 배양

소아로부터 얻은 타액을 BHI agar에 접종하였을 때의 생균수는 ml당 4.8×10^6 에서 1.3×10^6 이었다. 타액내 *Enterococcus*의 농도와 BHI agar 상에서 형성된 전체 세균의 농도와 비례하지 않았다 (Fig. 2). *Lactobacillus*와 *Streptococcus mutans*를 억제하는 *Streptococcus*의 타액내 농도도 Fig. 3과 Fig. 4에서 같이 BHI agar 상에서 형성된 전체 세균의 농도와 비례하지 않았다.

IV. 총괄 및 고찰

치태는 치아우식증 발생에 있어서 가장 중요한 역할을 한다. 치태 형성 초기에 타액에서 유래되는 당단백이 범랑질 표면에 흡착되어 획득피막을 형성하

Table 1. Inhibitory activity of the isolated bacteria on the formation of artificial plaque on the orthodontic wires

Test bacterial strains	Plaque weight + S.D. (mg)
<i>Streptococcus mutans</i> (<i>S. mutans</i>)	152±11
<i>Enterococcus durans</i>	2±1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3±2
<i>Streptococcus oralis</i>	3±3
<i>Enterococcus durans</i> + <i>S. mutans</i>	4±2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>S. mutans</i>	78±7
<i>Streptococcus oralis</i> + <i>S. mutans</i>	72±8

Table 2. Inhibitory activity of the isolated bacteria on the replication of *Streptococcus mutans*

Test bacterial strains	Colony forming units (/ml)	
	<i>S. mutans</i>	isolated bacteria
<i>Streptococcus mutans</i> (<i>S. mutans</i>)	3.6×10^6	
<i>Enterococcus durans</i>		8.5×10^8
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		6.8×10^8
<i>Streptococcus oralis</i>		2.8×10^8
<i>Enterococcus durans</i> + <i>S. mutans</i>	1.4×10^6	7.8×10^8
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>S. mutans</i>	5.6×10^6	7.0×10^8
<i>Streptococcus oralis</i> + <i>S. mutans</i>	3.8×10^6	2.5×10^8

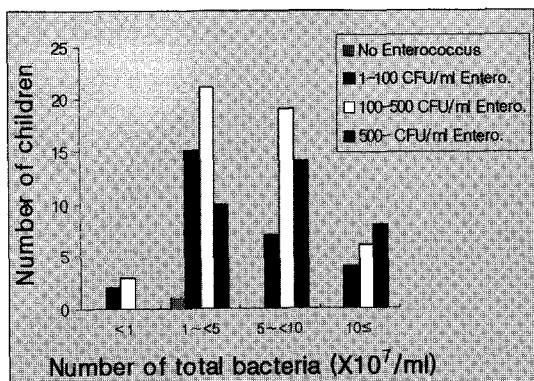


Fig. 2. Relationship between the concentration of total bacteria replicated on BHI agar and the concentration of *Enterococcus* replicated on BHI agar containing 6.5% NaCl.

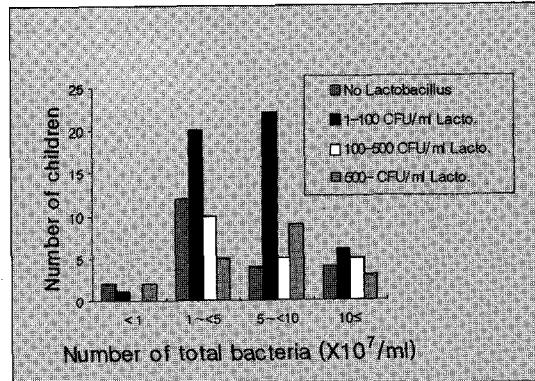


Fig. 3. Relationship between the concentration of total bacteria replicated on BHI agar and the concentration of *Lactobacillus* replicated on MRS agar.

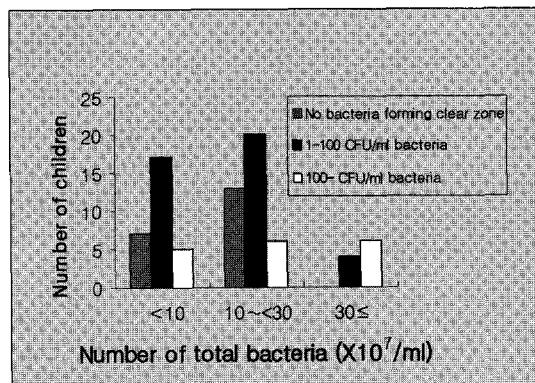


Fig. 4. Relationship between the concentration of total bacteria replicated on BHI agar and the concentration of *Streptococcus* inhibiting *Streptococcus mutans* on BHI agar containing 0.5% yeast extract and 5% sucrose.

는데 세균들은 초기에 이 퍼막과 비특이적으로 약하게 결합하여 증식하게 된다. 그러나 치아우식증의 주원인균으로 알려진 *Streptococcus mutans*가 외부로 glucosyltransferase를 분비하여 자당으로부터 세포의 다당류를 합성하게 됨에 따라 여러 세균들이 강하게 결합하게 된다. 세포의 다당류는 치태에 존재하는 세균에 의해 자당으로부터 합성되는데 포도당의 중합체인 글루캔과 과당의 중합체인 프럭坦으로 구분된다^[12,13].

*Enterococcus*는 catalase 음성인 그람 양성 구균으로 통성 혐기성 세균이다. 특징적으로 6.5% NaCl 첨가

배지에서 증식하며 bile-esculin 고체 배지에서 esculin을 가수분해하여 검정 색소를 만든다. 포도당을 발효시켜 유산을 생성하기 때문에 유산균의 범주에 넣고 있다. 일부 *Enterococcus*는 병원성 세균으로 문제시되고 있으나, *Enterococcus*는 인체에서 정상적으로 존재하며 건강한 사람에서 치은 열구의 총 미생물중 7.7%를 차지할 정도로^[14] 구강에 잘 생존한다. 본 연구에서 비커 와이어 검사를 한 *Enterococcus durans*는 구미에서 옛날부터 유산균 식품에 사용되는 비병원성 세균으로 간주되어 왔다.

*Lactobacillus*는 그람 양성 간균으로 유산을 많이 생성하여 치아우식증을 발생시키는데 있어서 *Streptococcus mutans* 다음으로 중요한 세균으로 보고되고 있다^[15]. 그러나 *Lactobacillus*가 구강에 존재하면서 인체에 해로운 작용을 나타내기도 하지만 일부 *Lactobacillus*에서는 bacteriocin과 H₂O₂를 분비함으로써 구강내 다른 세균을 억제하는 것으로 보고되고 있다^[16-18]. 본 연구에서 비커 와이어 검사를 한 *Lactobacillus acidophilus*는 유산균 발효유에 사용되는 세균이다.

*Streptococcus oralis*는 주로 치면에 존재한다. 영아의 구강내 연쇄상구균을 조사한 결과, *Streptococcus oralis*는 무치열의 1/3에서 존재하고 생후 1년 이내의 유치열에서도 1/3의 분포를 보였다^[19]. *Streptococcus*의 일부 세균들은 H₂O₂와 같은 물질을 분비해 *Streptococcus mutans*를 포함한 다른 세균들의 성장을 억제한다고 알려져 있는데 *Streptococcus oralis*와 같이

*Streptococcus mutans*를 억제하는 구강내 *Streptococcus*로는 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus sanguis* 등이 보고되었다²⁰⁾.

본 연구에서 사용한 세균 모두 비커 와이어 검사 결과, *Streptococcus mutans*에 의한 치태 형성을 억제하는 것으로 나왔는데, *Enterococcus durans*에 의한 치태 억제 작용이 가장 큰 것으로 나왔다. 이러한 치태 형성 억제 작용은 Table 2에서와 같이 *Streptococcus mutans*의 증식이 억제되어 치태 형성이 억제되는 것으로 사료된다.

글루캔 형성 억제와 관련이 있는 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans*를 억제하는 *Streptococcus*의 구강내 농도에 따라 타액내 전체 세균의 숫자가 좌우될 것으로 생각되었으나, 이러한 세균의 농도와는 관계없이 구강내 세균의 농도가 다양하게 나왔다. 이러한 결과는 타액 즉 구강내 세균의 숫자는 구강내 여러 가지 요소 또는 다른 많은 종류의 세균의 상호작용에 의해 결정되는 것으로 생각되며 추후 구강내 전체 세균의 농도에 영향을 미칠 수 있는 요소와 다른 종류의 세균도 연구하고자 한다.

V. 결 론

소아의 구강으로부터 분리한 비수용성 글루캔 형성 억제세균의 *Streptococcus mutans* 치태 형성에 대한 억제 정도와 분리 세균속의 타액내 농도가 타액내 전체 세균의 농도에 미치는 영향을 본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

구강으로부터 분리한 비수용성 글루캔 형성 억제세균의 효과를 비커 와이어 검사로 본 결과, 교정용 와이어상에 형성된 치태의 무게가 *Streptococcus mutans* 단독배양시 152mg에서 *Enterococcus durans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*와의 혼합배양시 각각 4mg, 78mg, 72mg으로 감소되었다. *Streptococcus mutans*의 생균수는 단독배양시 ml당 3.6×10^8 개에서 *Enterococcus durans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*와의 혼합배양시 각각 ml당 1.4×10^6 , 5.6×10^6 , 3.8×10^6 으로 감소하였다. 소아로부터 얻은 타액을 BHI agar에 접종하였을 때의 생균수는 4.8×10^6 에서 1.3×10^6 이었으나, 이러한 전체 세균의 농도는 타액내 *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans*를 억제하는 *Streptococcus*의 농도

와 관련이 없었다.

이상의 결과를 종합하면 소아의 구강으로부터 분리한 비수용성 글루캔 형성 억제세균의 *Streptococcus mutans* 치태 형성에 대한 억제는 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제하여 일어났으며, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans*를 억제하는 *Streptococcus*의 구강내 농도는 구강 즉 타액내 전체 세균의 농도에 영향을 미치지 않았다.

참 고 문 헌

- McDougall WA : Studies on the dental plaque I. The histology of the dental plaque and its attachment. Aust Dent J 8:261-273, 1963.
- McDougall WA : Studies on the dental plaque II. The histology of the developing interproximal plaque. Aust Dent J 8:398-407, 1963.
- Gibbons RJ, van Houte J : Dental caries. Ann Rev Med 26:121-136, 1975.
- Loesche WJ : Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev 9:65-107, 1976.
- Hamada S, Slade HD : Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44:331-384, 1980.
- Guggenheim B, Haller R : Purification and properties of an α -1,3 glucanohydrolase from *Trichoderma harzianum*. J Dent Res 51:394-402, 1972.
- Ebisu S, Kato K, Kotani S et al : Isolation and purification of Flavobacterium α -1,3-glucanase-hydrolyzing, insoluble, sticky glucan of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 124:1489-1501, 1975.
- Takehara T, Inoue M, Morioka T et al : Purification and properties of endo-alpha-1,3-glucanase from a *Streptomyces chartreus* strain. J Bacteriol 145:729-735, 1981.
- 양규호, 정진 : *Streptomyces*의 mutanase 유도에 관한 연구. 대한소아치과학회지 23:764-

- 773, 1996.
10. Kaster AG, Brown LR : Extracellular dextranase activity produced by human oral strains of the genus *Bifidobacterium*. *Infec Immun* 42:716-720, 1983.
 11. Staat RH, Schachtele CF : Characterization of a dextranase produced by an oral strain of *Actinomyces israelii*. *Infect Immun* 12:556-563, 1975.
 12. Guggenheim B : Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int Dent J* 20:657-678, 1970.
 13. Gibbons RJ, Banghart SS : Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Arch Oral Biol* 12:11-24, 1967.
 14. Socransky SS : Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* 49:203-222, 1970.
 15. Rosen R : Essential dental microbiology. Appleton & Lange. Norwalk. 341-356, 1991.
 16. Barefoot SF, Klaenhammer TR : Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 45:1808-1815, 1983.
 17. Collins EB, Aramaki K : Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 63:353-357, 1980.
 18. Atri A, Rekhif N, Michel M et al : Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. *Microbios* 75:117-123, 1993.
 19. Smith DJ, Anderson JM, King WF et al : Oral streptococcal colonization of infants. *Oral Microbiol Immunol* 8:1-4, 1993.
 20. van der Hoeven JS, Camp PJM : Mixed continuous cultures of *Streptococcus mutans* with *Streptococcus sanguis* or with *Streptococcus oralis* as a model to study the ecological effects of the lactoperoxidase system. *Caries Res* 27:26-30, 1993.

Abstract

RELATIONSHIP OF THE BACTERIA INHIBITING PLAQUE FORMATION AND THE NUMBER OF ORAL BACTERIA

Kyu-Ho Yang, Hyun-Ju Chung*, Jong-Suk Oh**

Department of Pediatric Dentistry, Department of Periodontology,
College of Dentistry, and Department of Microbiology, College of Medicine**,
Chonnam National University*

The inhibition degree of the isolated bacteria on plaque formation of *Streptococcus mutans*, and the effect of these bacterial genus on the concentration of total bacteria in saliva were assessed with the following.

The effectiveness of the isolated bacteria on the inhibition of plaque formation was assessed culturing *Streptococcus mutans* in the beaker with orthodontic wires. The mean weight of plaque produced on a wire was 152mg in the culture of *Streptococcus mutans* only, whereas being reduced to 4 mg, 78mg, or 72mg in the combined culture of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus durans*, *Lactobacillus acidophilus*, or *Streptococcus oralis*. The colony forming units (CFU) of *Streptococcus mutans* were 3.6×10^8 per ml in the culture of *Streptococcus mutans*, only, wheras being 1.4×10^6 , 5.6×10^6 , or 3.8×10^6 per ml in the combined culture of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus durans*, *Lactobacillus acidophilus*, or *Streptococcus oralis*. When saliva from children was inoculated on brain heart infusion agar, the colony forming units of bacteria were 4.8×10^6 to 1.3×10^9 per ml of saliva. The concentration of *Enterococcus*, *Lactobacillus*, or *Streptococcus* inhibiting *Streptococcus mutans* in saliva was not proportioned to that of total bacteria replicated on brain heart infusion agar.

These results indicate that the isolated bacteria inhibited the replication of *Streptococcus mutans*, resulting into inhibiting the formation of plaque, but the concentration of *Enterococcus*, *Lactobacillus*, or *Streptococcus* inhibiting *Streptococcus mutans*, in saliva might not affect the total bacterial concentration of saliva.

Key word : Plaque, *Streptococcus mutans*