

Black stain을 가진 유치 치태에서 추출한 방선균의 *S. mutans*에 대한 항생능 평가

박수진 · 김신 · 정태성 · 김재문

부산대학교 치의학전문대학원 소아치과학교실

국문초록

본 연구는 black stain을 가진 유치 치태에서 추출한 방선균이 *S. mutans*에 대해 항생능을 가지는가를 평가하고자 시도되었다. 만 2~6세 유치열기 어린이 중 black stain이 모든 치아에 존재하는 4명의 어린이를 대상으로 치태를 채취한 후, 증균 배양하여 16개의 방선균 균주를 분리해 냈으며, 이들이 생산해내는 물질이 항생능을 가지는지를 paper disc method를 이용하여 확인하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. No.1 균주와 No.5 균주에서 *S. mutans*에 항생능을 보였으며, 특히 No.5 균주는 Oxacillin과 유사한 항생능을 보였다.
2. No.1 균주와 No.5 균주는 일반적으로 항생능 평가시 사용되는 시험균인 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*에도 항생능을 보였다.
3. PCR을 통해 구강내 대표적인 상주 방선균들을 대상으로 이 균주들의 동정을 시도해본 결과 No.5 균주는 *Actinomyces viscosus*와 97% 일치하는 것으로 나타났다.

주요어 : Black stain, 방선균, 항생능, *S. mutans*.

I. 서 론

유치열기 및 혼합치열기 치아에 자주 나타나는 black stain은 chromogenic bacteria(색소 형성 세균)와 타액 또는 치은 열구 내 iron의 작용으로 생성되는 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾. 색소 형성 세균에 의해 생성된 hydrogen sulfide와 타액 또는 치은 열구 내 iron이 만나 ferric sulfide를 형성하게 되며, 이것이 black stain으로 불리고 있다. 한편, 이 black stain을 가진 어린이는 다른 색의 stain을 가진 어린이나 stain을 가지지 않은 어린이에 비해 낮은 우식 경험도를 가진다고 보고된 바 있고^{1,2,4-14)}, 그 이유로 다양한 의견들이 제시되었으나 아직 명확히 밝혀진 것은 없다. 일부 연구에서는 black stain을 가진 치아의 치태 분석에서 높게 나타나는 calcium, phosphate 때문일 것이라고 추측하고 있고^{2,4,7,9,13)}, 또 다른 연구들에서는 black stain을 가진 어린이의 구강 내 상주균 중 Streptococci의 비율이 black stain을 가지지 않은 어린이에 비하여 낮게 나타나 이것

이 낮은 우식률과 연관되었을 것이라고 추측하였다⁶⁾. 전자의 경우 calcium 과 phosphate가 법랑질의 탈회를 줄이고 완충능(buffering capacity)을 높여 우식 예방에 일조할 것이라고 설명하고 있으나 낮은 우식 경험도를 설명하기엔 부족하다는 의견이 지배적이다^{2,7)}.

기존의 연구 결과 black stain을 생성하는 주된 색소 형성 세균은 Actinomyces(방선균)와 Prevotella Melaninogenicus로 밝혀져 있다^{1-4,6,15)}. Black stain을 가진 어린이의 구강 내 상주균 중 82%가 방선균로 알려져 있으며⁶⁾, 방선균에 대한 기존 연구 중, 토양에서 추출한 방선균 일부가 치아 우식증의 주 원인균인 *Streptococcus mutans* (이하 *S. mutans*)에 대한 항생물질을 생산함이 이미 보고된 바 있다¹⁶⁾. 이런 연구들을 토대로 방선균 수의 증가와 *S. mutans*의 성장 억제 및 우식률 사이에는 연관이 있을 것으로 추론해 볼 수 있었고, 우식 원인균에 대한 방선균의 성장 억제작용을 밝혀낸다면 낮은 우식률의 근거를 제시할 수 있을 것으로 생각되었다. 이에 본 연구는 black stain을 가진 어린이의 치태에서 채취한 방선균의 *S. mutans*

교신저자: 박수진

부산시 서구 아미동 1-10/ 부산대학교 치의학전문대학원 소아치과학교실/ 051-240-7449/ liebelang@hanmail.net

원고접수일: 2008년 08월 27일 / 원고최종수정일: 2008년 11월 10일 / 원고채택일: 2008년 11월 17일

에 대한 항균 물질 생성 여부와 성장 억제효과를 규명할 목적으로 시도되었다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

만 2세에서 만 6세 사이 유치열기 어린이(4년 6개월 남아, 2년 3개월 여아, 6년 3개월 여아, 4년 10개월 남아) 중 최근 1개월 이내 항생제를 복용하지 않고, 일주일 이내 전문가 불소도포나 불소양치용액 사용을 하지 않았으며, black stain이 모든 치아에 나타난 4명의 어린이를 대상으로 하였다. 이 어린이 모두 DMFT는 0 이었다. 본 실험은 생명윤리위원회(IRB) 승인을 받았으며, 아울러 어린이 보호자들로부터 동의서를 획득한 후 시행하였다.

2. 치태 채취 및 운반

내원한 4명의 어린이로부터 Culture swab plus(BBLM microbiology, USA)를 이용하여 치태를 Swab 하여 transport medium(Table 1)에 넣었다. 시료 채취 후 24 시간 이내에 배양을 시행하였다.

Table 1. transport medium

Gelatin	8%
Fetal bovine serum	5%

3. 세균 배양 및 항생능 시험

1) 증균

35℃로 액체 배지에서(Table 2) 1주일 동안 증균을 시행하였다.

Table 2. Composition of HV agar medium

Humic acid	0.100%
Na ₂ HPO ₄	0.050%
KCl	0.171%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.001%
CaCO ₃	0.002%
B. Vits	0.050%
Cyclohexamide	0.005%
Nalidixic Acid	0.002%
Agar	1.750%

2) 선택 배양

1차 증균 후 Actinomyces agar Fluka 41159 선택 배지에 심어 35℃, pH 7.0 anaerobic atmospheric condition에서 2주 동안 배양을 하였다. 생성된 집락 중 형태적으로 다른 16개의 균주를 따로 분리하여 다시 액체배지와 Actinomyces agar

Fluka 41159 선택배지(Table 3) 등으로 subculture 하였다.

Table 3. Composition of Actinomyces agar Fluka 41159

Vegetable infusions powder	10g/l
Tryptose	10g/l
Tryptone	4g/l
yeast extract	5g/l
Dextrose	5g/l
L-Cysteine hydrochloride	1g/l
Starch	1g/l
Sodium chloride	5g/l
Monopotassium phosphate	15g/l
Ammonium sulphate	1g/l
Magnesium sulphate	0.2 g/l
Calcium chloride	20g/l
Agar	20g/l

3) 항생 물질의 생산

분리된 16개 균주의 항생능 유무를 조사하기 위해 Table 4의 배지를 이용해서 항생물질을 생산하도록 7일간 35℃, pH 7.0 에서 진탕배양 하였다. 이후 0.45 μm 주사기 필터(Millex-GS, Millipore, USA)를 이용해서 필터링을 하였다.

Table 4. Antibiotic production medium

Bacto-soytone	1.00%
Glucose	1.00%
NaCl	0.50%
CaCO ₃	0.10%

4) 항생능의 확인 (Paper disc method)

항생능은 filter paper disc (ADVATEC, 8 mm, Lot No. 70306691)를 사용하여 clear zone으로 확인하였다. 즉 배양액(30-40 μl)을 첨가한 paper disc를 시험균(*Streptococcus mutans* KCTC 3065)이 현탁된 Difco Mueller Hinton Agar(MHagar) 한천 고체배지 위에 가볍게 얹고 35℃에서 1~2일간 정지 배양하여 clear zone의 직경을 측정하였다. 이때 대조균으로 *S. mutans*에 항균작용을 하는 것으로 알려진 Oxacillin을 사용하여, 항생능을 나타내는 clear zone의 크기를 비교해 보았다. 여기서 사용된 시험균은 *S. mutans* 외에도 항생능 평가에 일반적으로 사용되는 균주들도 추가로 실험해 보았다. (*E. coli* ATCC 1130, *Bacillus cereus*.vav *mycoides* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus megaterium* ATCC 9885, *Bacillus stearothermophilus* var.*B calidolactis* ATCC 10149.)

4. 동정(Identification)

중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 이용하여 구강내 대표적 방선균을 대상으로 동정 시도 하였다 (*Actinomyces israelii* KCTC 5559, *Actinomyces naes-*

lundii KCTC 9013, *Actinomyces viscosus* KCTC 9146, *Actinomyces odontolyticus* KCTC 5535, *Actinomyces georgiae* KCTC 5528). Primer는 Kiyama 등¹⁷⁾ 의 연구에 기초하여 Table 5와 같이 제작하였으며, PCR 조건은 Table 6과 같다.

Table 5. Primers for PCR

Primers	Sequence	Size	Location	Direction
SIA1	5*-CGGCGATGTCATGACCTT-3*	18-mer	555-572	Forward
SIA2	5*-ATGCGGTAGTTGTGCGGTG-3*	18-mer	1293-1310	Reverse

Table 6. PCR conditioning

Tag buffer	5 µl				
dNTP	1 µl	95°C	2 min		
Primer(F)	1 µl	95°C	20 sec	30 cycle	
Primer(R)	1 µl	52°C	40 sec	30 cycle	
Template	1 µl	72°C	1 min	30 cycle	
Taq	0.5 µl	72°C	5 min		
B.D	0/5/10 µl				
D.W	to 50 µl				

(B.D; Band Doctor™ (SolGent, Korea), D.W; distilled water)

III. 연구결과

No.1에서 No.16의 균주 중 No.1 균주와 No.5 균주가 3개의 시험균(*Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*)에 항생능을 나타내었다. *S. mutans*에 나타난 clear zone의 크기는 대조균으로 쓰인 Oxacillin이 29.6 mm였으며, No.5 균주가 21.6 mm, No.1 균주는 미약한 수준으로 나타났다(Fig. 1). 이 두 균주는 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*에 대해서도 clear zone을 형성하였다(Fig. 2, 3, Table 7). PCR 동정 결과 No.5 균주에서 *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus* 와 같은 756bp의 특이 밴드가 검출되었다(Fig. 4, 5, Table 8). No.5의 좀 더 정확한 동정을 위해 SIA1, SIA2 primer로 sequencing 한 결과 *Actinomyces viscosus*와 97% 일치하는 것으로 나타났다(Table 9).

Table 7. Diameters of clear zone

Strains	No. 1	No.5
	Inhibitory zone(mm)	
<i>Streptococcus mutans</i>	8.6	21.6
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	11.6	14.5
<i>Bacillus subtilis</i>	9.6	13.8
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	-	-

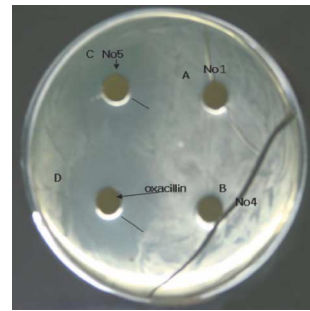


Fig. 1. Antibiotic activity test of Isolated *Actinomyces spp.* in MHagar cultured with *Streptococcus mutans* KCTC 3065.

A: Sample No.1, B: Sample No.4, C: Sample No.5, D: Oxacillin(Positive control)



Fig. 2. Antibiotic activity test of Isolated *Actinomyces spp.* in BST Medium cultured with *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

A: Sample No.5, B: Sample No.1

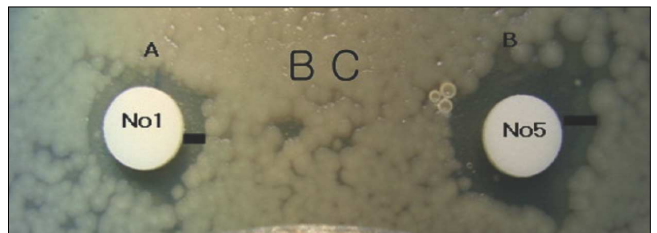


Fig. 3. Antibiotic activity test of Isolated *Actinomyces spp.* in BC Medium cultured with *Bacillus cereus* ATCC 11778.

A: Sample No.1, B: Sample No.5

Table 8. Sample of PCR

No.	1	2	3	4	5	6	7
sample name	No. 1	No. 5	A.	A.	A.	A.	A.
			<i>georgiae</i>	<i>viscosus</i>	<i>odontolyticus</i>	<i>naeslundii</i>	<i>israelii</i>

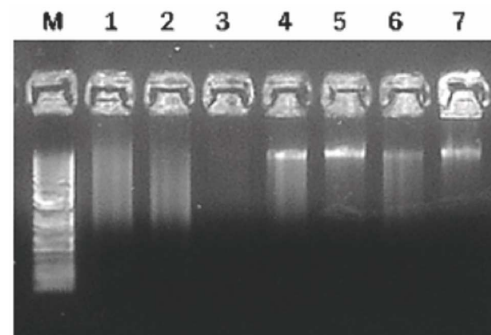


Fig. 4. Identification of sample gDNA.

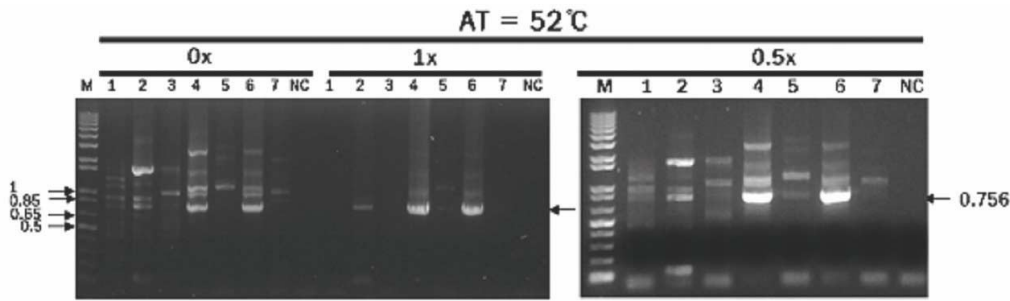


Fig. 5. Amplified 16s rDNA from samples. Primer set; SIA1, 5' -CGGC GATGTCATGACCTT-3' SIA2 5' -ATGCGGTAGTTGTCCGGTG-3' Final concentration of BD [Band Doctor™ (SolGent, Korea)] at PCR mixture: 0, 0.5x and 1x. Annealing Temp. (AT) =52℃ The arrow is product of PCR(Size = 756 bp). NC = Negative control (No template). Lane 1: No.1 spp., Lane 2: No.5 spp., Lane 3: *Actinomyces georgiae*, Lane 4: *Actinomyces viscosus*, Lane 5: *Actinomyces odontolyticus*, Lane 6: *Actinomyces naeslundii*, Lane 7: *Actinomyces israelii*.

Table 9. 16s rDNA sequence of No.5 spp

CACCAACACCAGCGGTGAGGCCACTCCTACGCCCGGCCTCGACGAACCTGTCCGGGAACGTCTCCAAGTGCCGGTGGCG- CAACGTCCCGGCCGGGACGACCAAGACCGACTGCACCGGCCTGGCCACGCACACGGTGACCGCCGAGGACCTCAAGGCCGGCGGCT- T C A C C C C G C A G A T C G C C T A C G A G G T C A A G G C C G T G G A G T A C G C C G G G A A G G C C C T G A G C A C C C C G - GAGACGATCAAGGGCGCGACGAGCCCGGTCAAGGCCAACTCGCTGCGGGTCGAGTCGATCACGCCGTCGTCGAGCCAGGAGAAC- TACAAGCTGGGCGACACCGTCACCTACAGGTGCGCGTTTCGCTCGGTGTCGGACAAGACGATCAACGTCGCCGCCACCGAATCCTCCT- T C G A C G A C C T G G G C C G C C A G T G C C A C T G G G G C G G C C T C A A G C C G G G C A A G G G C G C C G T C T A - CAACTGCAAGCCGCTCACTCACACGATCACGCAGGCCGACGTCGACGCGCCGCGCTGGACGCGCGTCGATCACCCCT- GACGGCCACCGGCACTGACGGCGCCGCCCTCCAGACGCTACCGCCACCGGCAACCCGATCAACGTCGTCGGCGAC- CACCCGACAGCCACGCCCGCACCGGCGCCGACGCGAGCTCGGAGCTACCGGCCTCGATGAGCCAGGCCAGGCCAGCACGTGGCCCCCA

IV. 총괄 및 고찰

Black stain은 특이하고 특징적인 치의 착색으로, 대개 영구 치열이나 유치열에서 최소 두 개 이상 치아의 협설측 치은선을 따라 나타나는 dark dot 의 집합으로 정의된다^{1,4)}. Black stain 의 구성 성분은 ferric sulfide로 색소형성 세균에 의해 생성된 hydrogen sulfide와 타액 또는 치은 열구 내 iron이 만나 형성 된다²⁾. 환아나 그 보호자들은 black stain이 비심미적이라는 점과 제거를 해도 다시 재발되는 것 정도로 인식하고 있으나¹⁸⁾, 기존의 연구자들은 black stain과 우식률의 상관성에 초점을 두고 많은 연구를 해 왔다. 대부분의 조사에서는 black stain을 가진 어린이의 경우 낮은 우식률을 보였지만^{1,2,4-14)}, 또 일부의 조사에서는 black stain이 우식의 유발률과 관계가 있는 것이 아니라 우식의 심화 정도와 관계가 있다는 주장도 있다⁴⁾. 지금까지 많은 연구자들이 black stain과 우식률의 상관성에 대한 이유를 밝히기 위해 다양한 가설들을 제시하였으며 많은 실험들을 해왔다. 대조군 보다 6배나 높은 phosphate 농도와 치태내의 높은 calcium 농도가 법랑질의 탈회를 줄이고 완충능 (buffering capacity)을 높인다는 보고가 있었으며^{2,7)}, 치태 내 높은 calcium 농도는 탄수화물의 낮은 농도와 관련 있다는 주장도 제시된 바 있다⁷⁾. Gasparetto 등⁴⁾은 black stain을 가진 어린이의 타액을 분석해 본 결과, 대조군 보다 calcium, phos-

phate, sodium, protein이 높게 나타나고 glucose가 낮게 나타나, 우식 감수성을 낮추는데 기여한다고 보고하고 있으나 그 어떤 것도 확실한 상관관계를 입증하지 못 하였고 하나의 가설로 제시되고 있다.

무기물 성분이 아닌 구강 내 세균총에 관한 연구들을 살펴보면 black stain이 없는 아동에 비하여 black stain을 가진 아동이 비교적 특징적이고 상대적으로 안정된 세균총을 가지고 있는 것으로 나타났다^{4,6)}. Black stain을 가진 유치열 아동에서는 그람 양성 세균(G+rods)이 90% 정도 차지하였고 그중 90%가 방선균인데 반하여, 대조군은 그람 양성 세균이 35~42%로 나타났다^{6,19-21)}. 이는 유치에서 black stain을 형성하는 주된 색소형성 세균이 방선균이라는 연구와도 일치하는 결과이다²⁾. 비록 구강 내에서 발견되는 방선균의 절반 이상이 그 종을 명확히 구별해 낼 수가 없었으나⁶⁾, 이 균의 비율에 따라 stain이 생길 수도, 안 생길 수도 있다고 알려져 있다. 우식의 주 원인균인 *S. mutans*의 경우 black stain을 가진 유치열기 아동에서 5%의 낮은 비율로 나타났으며 이는 black stain을 가진 아동에서 우식율이 낮은 한 이유로 추측되고 있으나^{6,22)}, *S. mutans*의 비율이 낮은 이유를 제시하는 연구는 아직 없었다.

이에 본 연구는 black stain을 가진 아동에서 낮은 우식율의 원인을 무기질 성분의 차이가 아닌 균들의 상호 억제와 연관이 있지 않을까하는 추측에서 black stain을 형성하는 색소형성

세균인 방선균과 *Bacteroides melaninogenicus*에 주목하였다.

*Bacteroides melaninogenicus*가 생산해 내는 black stain의 구성요소는 extracellular melanin, intracellular hemin, extracellular colloidal ferrous sulfide, 그리고 hemoglobin 파생물 등으로 다양하게 나타났으며²³⁻²⁵⁾, 치주염 환자에서 치은 출혈 시 혈액 성분을 이용하여 stain을 만들어 내기도 한다는 보고가 있었다¹⁾. 즉, 배지에 따라 다양한 종류의 stain을 만들어 내는 특성을 가졌지만 항생 물질이나 생리 활성 물질 또는 억제 물질 생산에 대한 보고는 없다.

한편 방선균은 방사상으로 발육하는 그람양성세균으로서, 이들은 주위의 영양원이 고갈됨에 따라 기균사(aerial mycelium)를 형성, 포자 형성 등의 형태학적 분화와 함께 항생물질, 색소, 생리활성물질 등 다양한 2차 대사산물을 생산하는 생리적 분화(physiological differentiation)의 특성을 가진다²⁶⁾. 특히 기존 연구에서 방선균은 다양한 항생물질을 만들어내는 것으로 밝혀졌는데, 1943년 *Streptomyces griseus*로부터 Streptomycin이 발견된 이래, 현재 까지 알려진 약 10,000여 종의 항생 물질 중 45%가 방선균에서 분리 되었다. 방선균은 균사상의 형태를 취하는 특징 때문에 하등생물인 곰팡이로 간주되기도 했지만, 지금은 '생육이 있는 단계에서 균사를 형성하는 세균' 또는 '분지하는 사상의 세균으로서, 어떤 과에서는 균사를 형성한다'고 정의되고 있다. 그만큼 고도의 형태 분화와 배양 특성의 다양성으로 아직도 새로운, 명명되지 않은 방선균들이 계속 발견되고 있다²⁷⁻²⁹⁾.

지금까지 분류된 방선균을 계통발생학적 측면에서 보면 산화형(oxidative form)과 발효형(fermentative)으로 대별되고 있다. 산화형은 분포 범위가 매우 다양하나 주로 토양에서 분리되고 있으며, 발효형은 사람과 동, 식물의 병원균으로서 널리 알려져 있다^{26,30)}. 구강 내에서는 현재 동정된 방선균 중, *Actinomyces israelii*과 *Actinomyces naeslundii*가 hydrogen sulfide를 생산해 내는 주요 균으로 알려져 있는데²⁾, 이 두 균은 방선균 중에서도 비교적 형태분화가 덜 발달되었으며, 신장한 균사가 분단되어 간균 혹은 구균상의 모양이 되는 발효형 균에 속하는 것으로 알려져 있으며²⁷⁾, 보통의 방선균이 고도 분화를 하는 *Streptomyces* 속에 속하는 것과는 구별된다. 또한 이 두 균주는 정상 세균총이기도 하면서 구강 내 방선균종의 주원인균으로도 알려져 있다.

본 실험 결과 총 16종류의 방선균 중 No.5와 No.1 두 균주가 항생 물질을 생산 하였으며, 대조균으로 쓰인 β -lactam 계통의 Oxacillin의 항생능 만큼은 아니었으나, 분명히 항생물질을 분비하여 *S. mutans*의 생장에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 기존 연구에 따르면 항생 물질을 생성해내는 방선균은 대부분이 토양에서 추출된 *Streptomyces* 속 균주였다. 방³¹⁾은 토양에서 추출된 방선균에서 *E. coli*, *Bacillus subtilis* 및 *Candida albicans*를 사멸시킬 수 있는 항생물질을 얻었고, 이와 홍³²⁾은 토양에서 추출한 방선균에서 methicillin-resistant staphylococcus aureus(MRSA)에 유용한 항생 물질을 얻었

는데, 이는 그람 양성 세균에 우수한 항생능을 보이는 반면 *E. coli*를 비롯한 그람 음성 세균에는 효과가 적었으며 진균류에는 전혀 작용을 하지 못하였다. 또한 박과 민³³⁾의 연구에서는 토양에서 추출된 방선균으로부터 그람 양성, 음성 세균 및 진균류 모두에 광범위한 효과를 보이는 항생물질을 얻었으나 *candida albicans*에는 항균력이 없었다.

본 연구에서도, No.1 과 No.5 균주가 생성한 항생물질이 *S. mutans* 및 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*에 항생능을 보였으나, 같은 그람 양성 세균이라도 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*보다 *S. mutans*에 훨씬 더 강력한 항생능을 보였다. 또한 No.1, No.5 모두 같은 *Bacillus* 균주라도 *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*에는 항생능을 보이지 않으며 그람 음성 세균인 *E. coli*에도 항생능을 보이지 않는 독특한 결과를 보여주었다. 이러한 결과의 명확한 해석을 위해서는 채취된 방선균 배양 방법의 다양화와 생성된 항생 물질의 성분 및 작용 기전에 대한 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

현재 항생능을 가진 것으로 알려진 방선균은 토양에서 추출되는 *Streptomyces* 속 균주에 속하는 경우가 대부분이나, 본 실험은 토양이 아닌 구강 내 방선균이라는데 의의가 있다. 이 두 균의 동정을 위해 대표적인 구강내 상주 방선균을 염두에 두고 PCR을 시행해 본 결과, No. 1균주는 일치하는 균주가 없었으며, No.5 균주에서는 *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*와 같은 756bp의 특이 밴드가 검출되었다. 좀 더 정확한 동정을 위해 SIA1, SIA2 primer로 sequencing 한 결과 *Actinomyces viscosus*와 97% 일치하는 것으로 나타났다. 즉 *Actinomyces viscosus* 아종으로 추측된다. 하지만 No. 1 균주는 동정이 되지 않았다. 방선균의 경우 conservative gene이 아직 정립되지 않아, PCR을 수행할 때 의심되는 균주를 선택하여 이들 균주가 서로 일치하는가를 확인하는 수 밖에 없다. 이는 방선균의 종류가 너무 많고 아직도 새로운 방선균이 계속해서 발견되고 있어, 아직 체계화된 연구가 성립되지 않았기 때문이다. 현재 발견된 95%의 방선균이 토양에서 추출된 *Streptomyces* 속이고 나머지 5%가 희소 방선균으로 분류되어지며, *Streptomyces* 속을 제외하고는 아직 그 연구가 미미한 단계라 동정을 위해서는 많은 연구가 필요한 실정이다²⁷⁾. 기존 연구에서 희소 방선균에 속하는 균주에서도 낮지만 항균활성이 나타난다는 보고와³⁴⁾, 방선균이 동정되는 경우가 아직도 50% 미만이라는 연구, 그리고 아직도 어느 균주에 더 가깝다는 정도의 확률로 동정하는 지금의 동정 기술 수준으로 보아³⁵⁻³⁷⁾, No.1 균주의 정확한 동정을 위해 생화학적 방법 및 계통학적 방법 등을 동원한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

최근 우식 원인균의 억제를 위하여 특정 미생물을 이용한 연구들이 시도되고 있다. 김 등³⁸⁾은 구강 내에서 분리된 장구균인 *Enterococcus durans*가 *S. mutans*에 대한 억제 작용이 있음을 보고 하였으며, 양과 정³⁹⁾은 토양에서 분리한 방선균 중 *streptomyces exfoliatus*가 mutanase를 생성하여 치태 형성

을 억제한다는 것을 보고하였다. 또한 *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus oralis*도 *S. mutans*의 치태 형성을 억제한다고 보고되었다⁴⁰⁾. 이번 연구에서 동정된 *Actinomyces viscosus*도 mutanase을 생성하여 치태 형성을 억제하는 능력이 있다는 것이 이미 보고되었다⁴¹⁾. 그러나 대부분의 연구가 우식 원인균의 생성물을 분해하여 우식의 가능성을 낮춘다는 정도로, 실질적 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다. 기존의 연구에서 치태 형성 억제 능력이 확인된 *Actinomyces viscosus*가 이번 연구 결과 *S. mutans* 자체에 대한 강력한 항생능이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 이 균주들이 우식이 없는 아동들로부터 채취되었다는 것으로 미루어 보아 실험실적인 효과 뿐 아니라 실질적인 효과도 있을 것으로 예상된다.

본 실험에서 주목할 점은 어떠한 질병을 일으키거나 특이할 만한 위해가 없는 매우 정상적인 상태에서, 특정 정상 균주가 타 균주에 대하여 항생능을 보이고 있다는 것이다. 기존 항생 물질들이 광범위한 항생능으로 인해 정상 균주에 까지 영향을 미치고 뜻하지 않는 부작용들을 유발하는 점을 생각해 볼 때, 본 연구에서는 인체의 생체항상성을 해치지 않으면서 특정 균주를 억제하는 상황을 만들 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다. 앞으로 이러한 항생 물질의 구성 성분 및 작용 기전 등에 대한 연구와, 우식 원인균에 대한 선택적 억제 물질의 개발 및 구강 내 방선균 생성물질들에 대한 심도 깊은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 black stain을 가진 유치 치태에서 추출한 방선균이 *S. mutans*에 대해 항생능을 가지는가를 평가하고자 시도되었다. 만 2~6세 유치열기 어린이 중 black stain이 모든 치아에 존재하는 4명의 어린이를 대상으로 치태를 채취한 후, 증균 배양하여 16개의 방선균 균주를 분리해 냈으며, 이들이 생산해 내는 물질이 항생능을 가지는지를 paper disc method를 이용하여 확인하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. No.1 균주와 No.5 균주에서 *S. mutans*에 항생능을 보였으며, 특히 No.5 균주는 Oxacillin과 유사한 항생능을 보였다.
2. No.1 균주와 No.5 균주는 일반적으로 항생능 평가시 사용되는 시험균인 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*에도 항생능을 보였다.
3. PCR을 통해 구강내 대표적인 상주 방선균들을 대상으로 이 균주들의 동정을 시도해본 결과 No.5 균주는 *Actinomyces viscosus* 와 97% 일치하는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Saba C, Solidani M, Berlutti F, et al. : Black stains in the mixed dentition: a PCR microbiological study

- of the etiopathogenic bacteria. J Clin Pediatr Dent, 30:219-224, 2006.
2. Reid JS, Beeley JA, McDonald DG : Investigations into black extrinsic tooth stain. J Dent Res, 56:895-899, 1977.
3. Brock DW, Georg LK : Characterization of *Actinomyces israelii* serotypes 1 and 2. J Bacteriol, 97:589-593, 1969.
4. Gasparetto A, Conrado CA, Maciel SM : Prevalence of black tooth stains and dental caries in Brazilian schoolchildren. Braz Dent J, 14:157-161, 2003.
5. Koch MJ, Bove M, Schroff J, et al. : Black stain and dental caries in schoolchildren in Potenza, Italy. ASDC J Dent Child, 68:353-355, 2001.
6. Slots J : The microflora of black stain on human primary teeth. Scand J Dent Res, 82:484-490, 1974.
7. Reid JS, Beeley JA : Biochemical studies on the composition of gingival debris from children with black extrinsic tooth stain. Caries Res, 10:363-369, 1976.
8. Okada M, Hayashi F, Nagasaka N : Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. J Clin Periodontol, 27:763-768, 2000.
9. McClure FJ : Further studies on the cariostatic effect of organic and inorganic phosphates. J Dent Res, 42:693-699, 1963.
10. Reid JS, MacDonald DC, Beeley JA: Studies on black extrinsic tooth stain. J Dent Res, Supplement to no.5:1050, 1974.
11. Shourie KL : Mesenteric line or pigmented plaque: A sign of comparative freedom from caries. J Am Dent Assoc, 35:805-807, 1947.
12. Hattab FN, Qudeimat MA, Al-Rimawi HS : Dental discoloration: an overview. J Esthet Dent, 11:291-310, 1999.
13. Bowen WH : The cariostatic effect of calcium glycerophosphate in monkeys. Caries Res, 6:43-51, 1972.
14. Lynch RJ : Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. Int Dent J, 54:310-314, 2004.
15. Coleman RM, Georg LK, Rozzell AR : *Actinomyces naeslundii* as an agent of human actinomycosis. Appl Microbiol, 18:420-426, 1969.
16. 박명호, 김정 : 토양으로부터 항생물질을 생산하는 방선균의 분리(타액 내 상재균 중심으로). 대구보건전문대학 논

- 문집, 17:69-79, 1997.
17. Kiyama M, Hiratsuka K, Saito S, *et al.*: Detection of Actinomyces species using nonradioactive riboprobes coupled with polymerase chain reaction. *Biochem Mol Med*, 58:151-155, 1996.
 18. Paredes Gallardo V, Paredes Cencillo C : Black stain: a common problem in pediatrics. *An Pediatr (Barc)*, 62:258-260, 2005.
 19. Kamma JJ, Diamanti-Kipiotti A, Nakou M, *et al.* : Profile of subgingival microbiota in children with primary dentition. *J Periodontal Res*, 35:33-41, 2000.
 20. Kamma JJ, Diamanti-Kipiotti A, Nakou M, *et al.* : Profile of subgingival microbiota in children with mixed dentition. *J Periodontal Res*, 15:103-111, 2000.
 21. Theilade J, Slots J, Fejerskov O : The ultrastructure of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res*, 81:528-532, 1973.
 22. Petersson GH, Bratthall D : The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sci*, 104:436-443, 1996.
 23. Reid JS, Beeley JA, McFarlane TW : A study of the pigment produced by *Bacteroides melaninogenicus*. *J Dent Res*, 55:1130, 1976.
 24. Duerden BI : Pigment production by Bacteroides species with reference to sub-classification. *J Med Microbiol*, 8:113-125, 1975.
 25. Tracy O : Pigment production in bacteroides. *J Med Microbiol*, 2:309-315, 1968.
 26. 아끼라 시마즈, 김창진, 유익동 : 방선균의 다양성-종류, 형태 및 생활 환. *산업미생물학회지*, 21:88-94, 1993.
 27. 일본방선균학회 : 바이오 사이언스와 방선균. *월드 사이언스*, 서울, 11-23, 2004.
 28. 윤원호 : 방선균이 생산하는 항생물질에 관한 연구-생산의 배양조건-서일공업전문대학논문집, 9:271-279, 1991.
 29. 이오석, 최충식, 최준호 등: 내열성 방선균 *Streptomyces thermocyan eoviolaceus*의 Xylanases를 이용한 자일로 올리고당의 생산. *산업미생물학회지*, 29:221-226, 2001.
 30. 박경수, 박을, 류진창 : 토양에서 분리한 방선균의 동정과 항균력의 검정. *한국토양비료학회지*, 14:90-103, 1988.
 31. 방병호 : 방선균 BY-019에 의한 광범위 항생물질의 생산에 관한연구. *범석학술논문집*, 1:287-295, 1997.
 32. 이동희, 홍환석 : 메치실린 내성 황색 포도상 구균에 유효한 항생물질을 생산하는 방선균의 선별 및 물질 생산 조건. *건국 기술 연구 논문집*, 24:179-190, 1999.
 33. 박명호, 민봉희: 치아우식 원인균 *Streptococcus mutans*에 항균력을 나타내는 미생물의 분리. *기초과학연구*, 15:151-157, 1999.
 34. 김소연, 박동진, 권오성 등: 국내 분리 방선균의 항균활성 특성. *산업미생물학회지*, 24:166-172, 1996.
 35. 양치우, 심우영, 이무형 등: 혀에 발생한 방선균증 1예. *대한피부과학회지*, 28:611-614, 1990.
 36. 이동선, 하상철, 신우창 등: 활성산소를 발생하는 항생물질을 생성하는 방선균 분리균주의 수리동정. *산업미생물학회지*, 23:397-404, 1995.
 37. 전진근, 조봉금 : 새로운 방선균의 탐색과 신규 유용 물질의 탐색 및 개발에 관한 연구. *건국자연과학연구지*, 4:149-165, 1993.
 38. 김용남, 양규호, 오종석 등: 구강에서 분리한 E.durans의 S.mutans와 S.oralis에 대한 작용. *대한소아치과학회지*, 27:361-369, 2000.
 39. 양규호, 정진 : Streptomyces의 mutanase 유도에 관한 연구. *대한소아치과학회지*, 23:764-773, 1996.
 40. 양규호, 오종석, 정현주 : 치태형성 억제세균과 구강내 세균수와의 관계. *대한소아치과학회지*, 26:459-465, 1999.
 41. 박진경 : 구강내에서 분리된 Actinomyces viscosus의 mutan 분해능에 관한 연구. *전남대학교 대학원 치의학 석사 논문*, 1-32, 1997.

Abstract

THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF *ACTINOMYCES* ISOLATED FROM PLAQUE OF
BLACK STAINED PRIMARY TEETH TO *STREPTOCOCCUS MUTANS*.

Soo Jin Park, Shin Kim, Tae Sung Jeong, Jae Moon Kim

Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Pusan National University

The aim of this study is to assess the antibiotic activity of *Actinomyces* in plaque from black stained primary teeth to *Streptococcus mutans*. Samples were obtained from four children, 2-6 years of age, who had black stains on all erupted primary teeth. 16 different *Actinomyces spp.* were isolated, and antibiotic activity test with paper disc method was done. The results were as follows.

1. No.1 and No.5 *Actinomyces spp.* showed the antibiotic activity to *Streptococcus mutans* and the activity of No.5 *Actinomyces spp.* could compete with that of Oxacillin.
2. No.1 and No.5 *Actinomyces spp.* also exhibited the antibiotic activity to *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* commonly used as experimental bacteria for testing antibiotic activity.
3. For identification of No.1 and No.5 spp., PCR analysis was done. No.5 spp. matched *Actinomyces viscosus* at 97% level but No.1 spp. didn't match.

Key words :Black stain, *Actinomyces*, Antibiotic activity, *S. mutans*.