

Polyphosphate가 *Porphyromonas endodontalis*의 성장에 미치는 영향에 관한 연구

경북대학교 치과대학 보존학교실

최성백 · 최호영 · 민병순 · 박상진 · 이진용 · 최기운

ABSTRACT

THE EFFECT OF POLYPHOSPHATE ON THE GROWTH OF *PORPHYROMONAS ENDODONTALIS*

Sung-Baik Choi, Ho-Young Choi, Byung-Soon Min
Sang-Jin Park, Jin-Yong Lee, Ki-Woon Choi

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Kyung-Hee University

Polyphosphate has been used to prevent decomposition of foods and has been shown to have inhibitory effect on the growth of gram positive bacteria. The purpose of this study was to evaluate the effect of polyphosphate on the growth of *Porphyromonas endodontalis*, a gram negative endodontopathic bacterium.

Porphyromonas endodontalis ATCC 35406 was grown in the presence of polyphosphates with different chain lengths. Inhibitory effect of each polyphosphate which was added at the beginning or during the culture, was determined by measuring the optical density of the bacterial cell at 540nm and by viable cell count.

The results from this study were as follows :

1. Polyphosphates were shown the growth inhibition of the *Porphyromonas endodontalis*.
2. The minimal inhibitory concentration(MIC) of polyphosphate was observed to be 0.04%.
3. Polyphosphates with chain lengths of 25 and 75 demonstrated the greatest inhibitory effect on the growth of *Porphyromonas endodontalis*.
4. Polyphosphates are bactericidal to *Porphyromonas endodontalis*, demonstrating the growth inhibition of the bacterium.

The overall results suggest that use of polyphosphate may affect the growth of *Porphyromonas endodontalis*. Further studies will be needed to confirm the effect of polyphosphate.

I. 서 론

대부분의 치수 및 치근단 질환은 직, 간접적으로 구강내 세균에 의해 유발된다. Miller¹⁾가 피사된 치수 조직에 미생물이 존재한다고 발표한 이래, 세균의 중요성이 인식되었고 그 이후에도 치수 및 치근단 질환의 대부분이 세균 감염과 이에 따른 직접적인 조직 파괴, 또는 세균에 대한 조직 반응으로 유발되는 이차적인 결과에 의한 것임이 밝혀졌다²⁻⁶⁾. 1970년대 초에는 초기 감염 세균들만 배양이 가능하여 근관 감염시에 나타나는 중요한 세균으로 인식되었지만, 혐기성 세균에 대한 배양 기술이 발달됨에 따라 근관 감염에서 혐기성 세균의 중요성이 점차 부각되었다⁷⁻⁹⁾.

1976년, Sundqvist¹⁰⁾는 근관 감염시 혐기성 세균이 많이 나타나는 것을 발견하였고, 근관 감염에 중요한 역할을 한다고 하였다. 최근 근관 치료에서 미생물에 대한 연구는 gram 음성 혐기성 세균들의 역할을 강조하였으며, 임상 증상을 수반하는 질환과 특정 세균 종류 사이의 상호 관련성을 밝히는 데 주력하고 있다. Sundqvist 등¹¹⁾, Kantz와 Henry¹²⁾, Sundqvist¹³⁾는 감염 근관에서 검출되는 세균의 90%가 혐기성 세균이라고 보고함으로써 근관 감염에서 혐기성 세균의 중요성이 재차 입증되었다. 진행된 감염 근관에서 발견되는 세균의 종류는 극히 한정되어 있는데, 이들 대부분은 배양시 혈액배지 상에서 흑색의 집락을 형성하는 혐기성 세균이다. 그 중에서도 *Porphyromonas*와 *Prevotella* 속에 속하는 세균이 주종을 이루고 있으며^{14,15)}, 특히 *Porphyromonas gingivalis*와 *Porphyromonas endodontalis*, 그리고 *Prevotella intermedia*가 근관 감염과 치근단 병소와 관련해서 나타나는 주된 세균종이라는 것이 입증되었고^{3,7,14,16-21)}, 급성 동통, 타진 반응, 삼출액 등의 증상과 관련이 깊은 것으로 밝혀졌으며²²⁻²⁶⁾, 또한 이 세균들은 급성 감염과도 관련된 것으로 알려졌다¹⁸⁾.

*Porphyromonas endodontalis*는 거의 예외 없이 근관 감염시에만 나타나는 세균으로 보고되었다²⁷⁻²⁹⁾. *Porphyromonas endodontalis*는 근관 감염에서 중요한 원인균임에도 불구하고 연구가 활발히 이루어지고 있지 않았으며, 근관 감염에

서 주된 세균으로서 역할을 하는데 관계가 있는 근관 감염기전이나 감염 억제에 관하여 보다 다각적인 연구를 필요로 한다.

Polyphosphate는 높은 에너지를 가진 phospho-anhydride 결합에 의해 연결된 수십~수백 개의 orthophosphate(Pi) residue의 선상 복합체로서, 모든 생명체(세균, 곰팡이, 원생동물, 식물, 포유동물 등)에서 발견된다³⁰⁾. 이러한 polyphosphate의 기능은 ATP 대체원과 에너지원, 무기 phosphate의 저장고, 금속(Ca, Mg)이온의 chelator, 알칼리 이온의 중화, stress와 생존의 조절, 발육 조절 등 다양한 기능을 가지며, 또한 다른 금속(Zn, Fe, Cu, Cd)과의 chelation을 통해서도 세균의 독성을 감소시키고 세균의 기능에 영향을 준다³¹⁾. Polyphosphate는 여러 가지 목적을 위해 식품, 특히 육류에 첨가하는 인체에 무해한 물질이다. 육류에 첨가된 polyphosphate는 수분 유지, 유제화(emulsification)의 증가, 산화에 의한 악취와 변색의 방지, 훈제시 색조를 유지시키는 효과를 위해 사용되고 있다³²⁾.

이러한 polyphosphate의 효과는 세균을 억제하는 능력과 관련이 있는 것으로 보이는데, Lee 등³²⁾은 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과 실험에서 polyphosphate가 강한 음이온을 나타내어 금속 이온의 chelator로 작용하여 세균의 세포벽과 세포질에서 구조적으로 필수적인 Ca^{2+} , Mg^{2+} 과의 chelation을 통해 항세균 효과를 보인다고 보고하였다. 또한 Jen과 Shelef³³⁾은 세균 증식에 필수적인 양이온과 polyphosphate가 안정된 복합체를 형성하여, 대사 기능을 억제하고 성장을 방해한다고 하였다. Knabel 등³⁴⁾도 polyphosphate가 gram 양성 세균의 세포벽에 존재하는 금속 양이온에 대하여 높은 친화력을 나타내어 세포벽으로부터 필수 금속 양이온을 제거하여 세균 성장을 억제한다고 보고하였다. 구강세균에 대한 항균효과에 대해 Shibata와 Morioka³⁵⁾는 polyphosphate가 *Streptococcus mutans*의 성장을 억제하고 치태 형성을 감소시킨다고 보고하였다.

이와 같이 polyphosphate가 gram 양성 세균에 대해 성장 억제 효과가 있음이 입증되었으나, gram 음성 세균에 대한 보고는 아주 미미한 상

태이므로 본 연구에서는 gram 음성 세균 중에서도 감염 근관에서 많이 검출되고 급성 동통, 타진 반응, 삼출액의 증상과 조직 파괴에 관여하는 *Porphyromonas endodontalis*에 대하여 polyphosphate의 성장 억제효과 여부를 관찰하고 그 항균효과를 분석함으로써 감염 근관 치유에 사용 가능성을 확인하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험균주 및 배양

실험균주로는 *Porphyromonas endodontalis* 세균종의 대표 균주인 ATCC 35406을 사용하였고 배지로는 brain heart infusion(BHI : Difco) broth를 사용하여 *Porphyromonas endodontalis*를 접종한 후, 혐기성 배양기(85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂)에서 37°C하에 배양하였다³⁶⁾.

2) 실험재료 및 기구

세균 성장을 위하여 yeast extract(5mg/ml), hemin(5µg/ml), vitamin K(0.2µg/ml)가 포함된 BHI 액체배지를 사용하였다.

Polyphosphate의 항균 효과를 관찰하기 위하여 사슬 길이 5, 15, 25, 35, 45, 65, 75의 sodium polyphosphate와 13과 18의 혼합물인 calgon을 사용하였다. Polyphosphate crystal을 증류수에 용해시킨 후, syringe filter(0.45µm)를 이용하여 여과 멸균하였다.

Polyphosphate와 함께 세균을 배양한 후, polyphosphate의 최소 억제농도 (minimal inhibitory concentration : MIC)를 결정하기 위하여 1.5ml cuvette에 넣고 분광광도계(spectrophotometer : Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech Co.)를 사용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

세균의 균일한 혼합과 분포를 위하여 vortex mixer(Vortex-2 genie, Scientific Industries Co.)를 사용하였고, 세균을 일정량 접종하기 위하여 피펫(Pipetman, Gilson Co.)을 사용하였다. 결정된 MIC에서 polyphosphate가 살균효과를

보이는지를 확인하기 위한 실험에서 *Porphyromonas endodontalis*의 희석을 위하여 phosphate buffered saline(PBS)을 이용하였다. 또한 결정된 MIC에서 polyphosphate가 살균효과를 나타내는지를 확인하기 위한 생균수 측정을 시행함에 있어 BHI 액체배지에 면양 적혈구를 5% 첨가한 혈액 한천배지를 제작하여 *Porphyromonas endodontalis*의 성장 유무를 확인하였다.

2. 실험방법

1) MIC 결정실험

10ml BHI 액체배지를 첨가한 tube에 *Porphyromonas endodontalis*를 접종하고 나서 polyphosphate를 각각 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1% 씩 첨가한 다음, 24, 52시간 동안 혐기적으로 배양하였다. 그 후 polyphosphate의 농도군 별 세균 성장 측정을 관찰하고 MIC를 결정하기 위하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 세균 성장 억제효과 실험

앞의 실험에서 배양 초기에 polyphosphate를 첨가하여 성장 억제효과를 확인한 MIC 농도만큼 polyphosphate를 *Porphyromonas endodontalis*의 대수 증식기(exponential phase)에 첨가하였을 때, 세균 성장 억제효과가 있는지를 알아보기 위한 실험을 시행하였다. 즉, *Porphyromonas endodontalis*를 흡광도가 0.7이 될 때까지 증식시킨 후, polyphosphate를 0.03, 0.04, 0.05% 농도로 첨가하고 흡광도 변화를 관찰하였다. 흡광도 변화는 polyphosphate 접종 14, 24, 그리고 38시간 후에 관찰하였다.

3) 생균수 측정(Viable cell count)

Polyphosphate의 *Porphyromonas endodontalis*에 대한 성장 억제효과가 정균 효과(bacteriostatic effect)인지, 살균효과(bactericidal effect)인지를 확인하기 위하여 생균수를 측정하였다. 이를 위해 혈액 한천배지를 제작하고 각 polyphosphate 농도군에서 채취한 세균을 PBS를 이용하여 10⁻¹~10⁻⁶으로 단계 희석한 다

Table 1. Inhibitory effect of polyphosphate on the growth of *Porphyromonas endodontalis*.^a

Chain length of polyphosphate	Polyphosphate concentration(%)					
	0.02		0.03		0.04	
5	1.123 ^b	1.601 ^c	1.647	1.950	0.101	0.031
15	1.170	1.468	0.720	1.069	0.086	0.048
25	1.175	1.637	0.168	0.969	0.079	0.040
35	1.194	1.600	0.206	1.028	0.087	0.042
45	1.152	1.588	1.559	1.849	0.092	0.069
65	1.097	1.525	0.117	0.753	0.119	0.101
75	1.164	1.593	0.113	0.473	0.077	0.042
calgon	1.680	2.050	0.407	1.143	0.088	0.095

a : Polyphosphates were added at the beginning of the cell culture.

b : Optical density was measured after 24h of the cell culture.

c : Optical density was measured after 52h of the cell culture.

음, 혈액 한천배지에 회석액 100 μ l를 적하한 다음, 균일한 혼합을 위해 배지 표면상에서 유리구슬(glass bead)과 함께 넣고 잘 흔들어 세균을 배지위에 균일하게 도포하였다. 혐기성 배양기에서 집락 형성이 육안으로 확인될 때까지 배양한 후 나타난 집락수를 세어 생균수를 측정하였다.

III. 실험성적

1. MIC 결정실험

배양 시작과 함께 polyphosphate를 첨가하고 24시간 배양한 경우, 0.02%에서는 억제효과가 나타나지 않았다. 0.03%의 농도에서는 사슬길이

25, 35, 65, 75의 polyphosphate가 큰 억제효과를 보였다. 0.03% 보다는 0.04% 농도에서 보다 뚜렷한 억제효과의 차이를 관찰할 수 있었다. 억제효과는 사슬길이 짧은 것보다는 긴 것, 특히 75 사슬길이에서 가장 큰 억제효과가 나타났다. 반면, 짧은 사슬길이 중에서도 25인 경우, 0.04%에서 75와 비슷한 억제효과를 보였다. 한편, 52시간 동안 배양한 경우, 0.02%에서는 어느 사슬길이의 polyphosphate도 억제효과가 나타나지 않았다. 0.03%에서도 사슬길이 25, 65, 75에서 감소

하는 경향이 나타났으나 뚜렷한 억제효과는 관찰되지 않았다. 0.04% 농도에서는 거의 모든 사슬길이의 polyphosphate가 억제효과를 보였다 (Table 1).

2. 세균 성장 억제효과 실험

가장 큰 억제효과를 보인 사슬길이 25와 75를 실험에 사용하였다. 일정시간 *Porphyromonas endodontalis*를 배양하여 흡광도가 0.7에 도달했을 때 polyphosphate를 0.03, 0.04, 0.05% 첨가한 후 흡광도의 변화를 관찰한 결과, 0.03%에서는 계속해서 흡광도가 증가하였으나 0.04, 0.05%에서는 흡광도가 미미하게 증가하거나 억제되는 것으로 나타났다. 사슬길이 25와 75간에는 성장 억제효과의 차이가 발견되지 않았다(Fig. 1,2,3).

3. 생균수 측정

흡광도의 감소, 또는 흡광도가 약간 증가하는 상태가 실제적으로 *Porphyromonas endodontalis*의 살균 상태에 의한 것 때문인지를 확인하기 위하여 앞에서 배양한 *Porphyromonas endodontalis*의 액체배지 시료를 혈액 한천배지 상에 도말하여 액체배지 내에 존재하는 생균수를

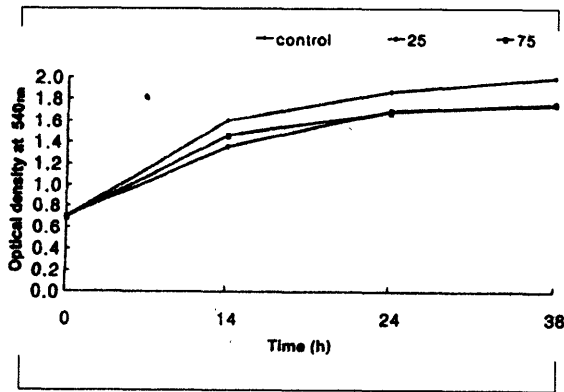


Fig. 1. Changes of optical density with the lapse of time in the presence of 0.03% polyphosphate. *Porphyromonas endodontalis* was grown up to optical density 0.7 at 540nm and then 0.03% polyphosphate (chain length 25, 75) was added to the culture. The optical density of the cell was obtained 14, 24, 38h after the polyphosphate added.

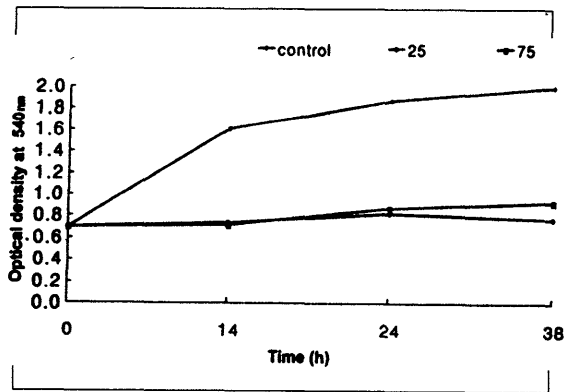


Fig. 2. Changes of optical density with the lapse of time in the presence of 0.04% polyphosphate. The procedure was performed as described in Fig. 1.

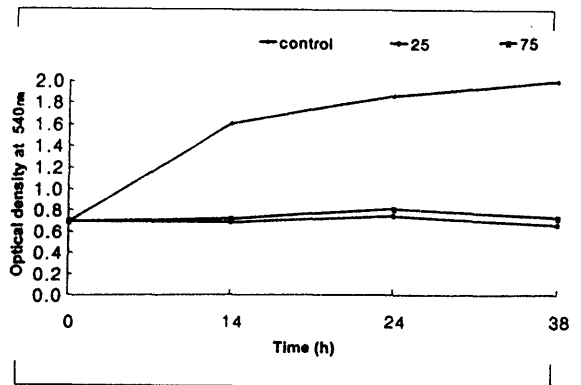


Fig. 3. Changes of optical density with the lapse of time in the presence of 0.05% polyphosphate. The procedure was performed as described in Fig. 1.

측정하였다. 대조군의 액체배지와 0.03%로 polyphosphate를 첨가한 액체배지에서는 시간이 경과함에 따라 *Porphyromonas endodontalis*의 생균수가 점차 증가하였다. 반면, 농도가 0.04, 0.05%인 polyphosphate를 첨가한 액체배지에서는 점차 생균수가 감소하였다. Polyphosphate 농도가 0.04, 0.05%일 때는 사슬길이 25가 75보다 생균수 감소 효과가 큰 것으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Viable cell counts of *Porphyromonas endodontalis* with the lapse of time after polyphosphate added.^a

Time(h)	Polyphosphate : Chain length 25				Chain length 75		
	control	0.03%	0.04%	0.05%	0.03%	0.04%	0.05%
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
14	531.0	273.0	27.0	2.7	321.0	37.1	20.0
24	608.1	402.0	17.6	0.3	494.9	48.4	2.0
38	531.0	482.0	13.4	0	528.0	40.1	0.2

a : Polyphosphates were added when the optical density of *Porphyromonas endodontalis* reached 0.7 at 540nm. Viable cell counts were determined 0, 14, 24, 38h after the addition of polyphosphates and the counts were converted into percentage.

IV. 총괄 및 고안

Polyphosphate는 인체에 무해하며 효과적인 항균제제로 사용이 가능한 것으로 보고된 바 있다. *Staphylococcus aureus*에 대한 항균효과 실험에서 polyphosphate가 금속 이온의 chelator로 작용하여 세균의 세포벽과 세포질에서 구조적으로 필수적인 Ca^{2+} , Mg^{2+} 과의 chelation을 통해 항균 효과를 보였으며³²⁾, Jen과 Shelef³³⁾는 세균 증식에 필수적인 양이온과 polyphosphate가 안정된 복합체를 형성하여, 대사 기능을 억제하고 성장을 방해한다고 보고하였다. 또한 Knabel 등³⁴⁾도 polyphosphate가 gram 양성 세균의 세포벽에 존재하는 금속 양이온에 대하여 높은 친화력을 가져 세포벽으로부터 필수 금속 양이온을 제거하여 성장을 억제한다고 보고하였고, 구강세균에 대한 polyphosphate의 효과에 관한 연구에서 Shibata와 Morioka³⁵⁾는 polyphosphate가 *Streptococcus mutans*의 성장을 억제하고 치태 형성을 감소시킨다고 보고하였다.

Gram 양성 세균에 비해 gram 음성 세균에 대한 polyphosphate의 세균 억제효과에 대한 연구는 미미한 실정이다. 이에 본 실험에서 gram 음성 세균인 *Porphyrromonas endodontalis*에 대한 성장 억제효과를 관찰하였다. 세균 성장곡선 중 성장 유도기(lag phase), 즉 배양 초기에 polyphosphate를 *Porphyrromonas endodontalis*와 동시에 첨가하고 혐기적으로 배양한 결과, *Porphyrromonas endodontalis*에 대한 polyphosphate의 MIC는 0.04%로 나타났다. MIC에서는 24시간 동안 뿐 만 아니라 52시간 동안 배양한 경우에서도 성장 억제효과가 지속되었다.

이와 같은 결과는 임상적으로 polyphosphate를 사용할 경우, 낮은 농도로도 장시간 동안 세균 성장 억제효과를 기대할 수 있다는 가능성을 시사한다고 사료된다.

MIC 농도인 0.04%를 세균이 이미 많은 수로 증가한 대수 증식기(exponential phase)에 첨가하였을 경우 세균 증식에 어떤 영향을 미치는지에 대해서도 흡광도로 관찰한 결과, polyphosphate 사슬길이 25와 75에서 모두 대조군과 0.03%의 polyphosphate를 첨가한 경우에는 시

간이 경과함에 따라 점차적으로 흡광도가 증가하는 반면, 0.04, 0.05%의 polyphosphate를 투여하였을 때는 흡광도가 약간 증가하거나 증가하지 않는 것으로 관찰되었다(Fig. 1, 2, 3). Polyphosphate가 *Porphyrromonas endodontalis*에 대해 정균효과만 갖거나, 또는 살균효과가 있어도 용해시키지 않거나, 용해시키더라도 세포벽 물질이 잔존되어 흡광도가 감소하지 않을 수도 있기 때문에 흡광도 측정만으로는 균의 생사 여부, 더 나아가서 polyphosphate의 실제효과를 판단하기 어렵다. 따라서 polyphosphate의 효과가 정균효과인지, 살균효과인지를 확인하기 위하여 생균수 측정을 시행한 결과, 0.04, 0.05%의 polyphosphate를 투여한 배지에서는 시간 경과에 따라 세균수가 감소하는 것으로 나타났다(Table 2). 이는 polyphosphate가 살균효과를 갖고 있음을 시사하는 것이고, MIC 0.04%로도 polyphosphate가 증식하기 시작하는 적은 수의 *Porphyrromonas endodontalis* 성장을 억제할 수 있을 뿐 만 아니라, 이미 많은 수의 *Porphyrromonas endodontalis*가 존재하더라도 충분히 그 성장을 억제할 수 있다는 것을 의미하는 것이다. 이 사실은 polyphosphate를 임상적으로 적용하였을 경우 큰 장점이 될 수 있을 것으로 사료된다. 즉 감염 예방이나 초기 근관 감염시 감염 진행을 억제하거나 더 나아가서 이미 진행된 감염 치료시에도 polyphosphate를 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Shibata와 Morioka³⁵⁾는 짧은 사슬길이, 최대 6까지의 polyphosphate를 사용하여 *Streptococcus mutans*에 대하여 유의있는 억제효과가 있음을 발견하였으며, 본 실험에서 *Porphyrromonas endodontalis*는 짧은 사슬길이의 polyphosphate보다 긴 사슬길이, 즉 25 이상의 사슬길이 일 때 효과가 큰 것으로 나타났다.

*Streptococcus mutans*에 대한 polyphosphate의 성장 억제효과에 대한 예비실험에서도 *Porphyrromonas endodontalis*에 대해서와 동일하게 짧은 사슬길이보다는 긴 사슬길이의 polyphosphate가 효과가 더 큰 것으로 나타났다.

따라서 polyphosphate는 일반적으로 긴 사슬의 polyphosphate가 세균 성장 억제효과가 큰 것으

로 생각된다. 그러나 사슬길이 25의 polyphosphate가 사슬길이 35~65보다 *Porphyromonas endodontalis* 성장 억제효과가 크고, 75와 비슷한 효과가 있는 것으로 미루어 특정 세균에 대하여 사슬길이의 특이성이 있는 것으로 보인다.

본 실험을 통해 polyphosphate가 gram 음성 세균인 *Porphyromonas endodontalis*에 대하여 세균 성장 억제효과가 있음을 확인하였으며, 이후에도 polyphosphate를 수산화칼슘처럼 근관 치료약물로 사용할 수 있는지 등에 관한 임상 적용에의 시도가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 polyphosphate가 *Porphyromonas endodontalis*의 성장에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 *Porphyromonas endodontalis*의 배양 초기와 대수 증식기에 polyphosphate를 투여하였을 경우 polyphosphate의 세균 성장 억제효과 여부를 평가하기 위하여 실험을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Polyphosphate가 *Porphyromonas endodontalis*에 대하여 성장 억제효과가 있었다.
2. *Porphyromonas endodontalis*에 대한 polyphosphate의 최소 세균 성장억제 농도(MIC)는 0.04%이었다.
3. *Porphyromonas endodontalis*의 성장억제는 polyphosphate의 사슬길이 25와 75에서 가장 큰 효과를 보였다.
4. *Porphyromonas endodontalis*에 대한 polyphosphate의 성장 억제효과는 살균작용에 의한 것이다.

이상의 결과에서 polyphosphate의 억제효과는 사슬길이의 특이성이 있는 것으로 나타났다.

REFERENCES

1. Miller, W. D. : Microorganisms of the human mouth. S.S. White Dental Co., Philadelphia, 1890 (cited from the reference No. 5).
2. Zavistoski, J., van Winkelhoff, A. J., Van Steenberg, T. J., Dzink, J., and Onderdonk, A. :

Quantitative bacteriology of endodontic infections. Oral Surg., 49:171-174, 1980.

3. Fukushima, H., Yamamoto, K., Hirohara, K., Saggawa, H., and Leung, K-P. : Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. J. Endodon., 16:534-538, 1990.
4. Kakehashi, S., Stanley, H. R., and Fitzgerald, R. J. : The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg., 20:340-349, 1965.
5. Kettering, J. D., and Torabinejad, M. : Microbiology and immunology. p.363-376. In Cohen, S., and Burns, R. C., Pathways of the pulp, Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 1994.
6. Pisano, J. V., and Weine, F. S. : Microbiology of endodontics. p.693-712. In Weine, F. S., Endodontic therapy, Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 1996.
7. Griffe, M. B., Patterson, S. S., Miller, C. H., Kafrawy, A. H., and Newton C. W. : The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. Oral Surg., 50:457-461, 1980.
8. Attebery, H. R., Kimura, J. T., and Carroll, G. W. : An acute anaerobic infection following endodontic treatment. J. Endodon., 6:793-795, 1980.
9. Kannagara, D. W., Thadepalli, H., and McQuirter, J. L. : Bacteriology and treatment of dental infections. Oral Surg., 50:103-109, 1980.
10. Sundqvist, G. : Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Thesis. Umeå University, Odontology, Dissertation No. 7, 1976 (cited from the reference No. 6).
11. Sundqvist, G., Carlsson, J., Herrmann, B., and Tärmvik, A. : Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. J. Med. Microbiol., 19:85-94, 1985.
12. Kantz, W. E., and Henry, C. A. : Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chamber of nonvital teeth in man. Arch. Oral Biol., 19:91, 1974.
13. Sundqvist, G. : Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umeå University Odontogenical dissertation. No. 7, Umeå, Sweden, 1976, University of Umeå.
14. Haapasalo, M. : *Bacteroides* spp. in dental root

- canal infections. *Endod. Dent. Traumatol.*, 5:1-10, 1989.
15. Sundqvist, G., Johansson, E., and Sjögren, U. : Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J. Endodon.*, 15:13-19, 1989.
 16. Baumgartner, C., and Falkler, W. A. : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. *J. Endodon.*, 17:380-383, 1991.
 17. van Winkelhoff, A. J., Carlee, A. W., and de Graaff, J. : *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect. Immun.*, 49:494-497, 1985.
 18. Haapasalo, M., Ranta, H., Ranta, K., and Shah, H. : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infect. Immun.*, 53:149-153, 1986.
 19. Sundqvist, G. : Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol. Immunol.*, 7:257-262, 1992.
 20. Baumgartner, J. C., and Falkler, W. A. Jr. : Reacti-Tanner, A., and Stillman, N. : Oral and dental lesions with implicated microorganisms. *J. Endodon.*, 17:207-212, 1991.
 21. Tanner, A., and Stillman, N. : Oral and dental infections with anaerobic bacteria : clinical features, predominant pathogens, and treatment. *Clin. Infect. Dis.*, 16(Suppl.):S304-S309, 1993.
 22. Yoshida, M., Fukushima, H., Yamamoto, K., Ogawa, K., Toda, T., and Sagawa, H. : Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J. Endodon.*, 13:24-28, 1987.
 23. Hashioka, K., Yamasaki, M., Nakane, A., Horiba, N., and Nakamura, H. : The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J. Endodon.*, 18:558-561, 1992.
 24. Chen, H. : The correlation of black-pigmented *Bacteroides* spp. to symptoms associated with apical periodontitis. *Chung-Hua Kou Chiang i Hsueh Chinese, J. Stomatol.*, 20:70-72, 1991.
 25. van Steenberg, T. J. M., van Winkelhoff, A. J., Mayrand, D., Grenier, D., and de Graaff, J. : *Bacteroides endodontalis* sp. nov., asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* from infected dental root canals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34:118-120, 1984.
 26. Haapasalo, M., Ranta, H., Shah, H., Ranta, K., and Lounatmaa, K. : Isolation and characterization of a new variant of black pigmented assaccharolytic *Bacteroides*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 23:269-274, 1984.
 27. Jousimies-Somer, H. R. : Update on the taxonomy and the clinical and laboratory characteristics of pigmented anaerobic gram-negative rods. *Clin. Infect. Dis.*, 20(Suppl.):S187-S191, 1995.
 28. Mayrand, D., and Holt, S. C. : Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.*, 52:134-152, 1988.
 29. van Winkelhoff, A. J., van Steenberg, T. J. M., and de Graaff, J. : The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J. Clin. Periodontol.*, 15:145-155, 1988.
 30. Kulaev, I. S. : The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1979.
 31. Kornberg, A. : Minireview ; Inorganic polyphosphate : Toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.*, 177:3:491-496, 1995.
 32. Lee, R. M., Hartman, P. A., Stahr, H. M., Olson, D. G. and Williams, F. D. : Antibacterial mechanism of long-chain polyphosphates in *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.*, 57:4:289-294, 1994.
 33. Jen, C. M. C., and Shelef, L. A. : Factors affecting sensitivity of *Staphylococcus aureus* 196E to polyphosphates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:4:842-846, 1986.
 34. Knabel, S. J., Walker, H. W., and Hartman, P. A. : Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected gram-positive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. *J. Food Prot.*, 54:5:360-365, 1991.
 35. Shibata, H., and Morioka, T. : Antibacterial action of condensed phosphates on the bacterium *Streptococcus mutans* and experimental caries in the hamster. *Arch. Oral Biol.*, 27:809-816, 1982.
 36. Lee, J. Y., Sojar, H. T., Bedi, G. S., and Genco, R. J. : *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriin : size, amino-terminal sequence, and antigenic heterogeneity. *Infect. Immun.*, 59:383-389, 1991.