

구강에서 분리한 *E. durans*의 *S. mutans*와 *S. oralis*에 대한 작용

김용남 · 양규호 · 오종석* · 정진**

전남대학교 치과대학 소아치과학교실, 의과대학 미생물학교실*, 부산대학교 치과대학 구강미생물학교실**

국문초록

장구균은 사람의 구강, 질, 장내 등에 정상적으로 존재하는 세균이다. 본 연구에서는 구강에서 분리된 장구균종 *Enterococcus durans*로 동정된 분리균주 4주의 특성과 구강내 주요 세균인 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus oralis*와의 관계를 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리균주에 대한 당 발효 검사와 생화학적 검사 결과, 비슷한 양상을 보였다.
2. 분리균주 모두 erythromycin, penicillin, tobramycin, ampicillin, teicoplanin, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, kanamycin 및 streptomycin에 대해 감수성을 보였다.
3. *S. mutans*를 일회용 큐벤에서 단독 배양시 550 nm에서의 흡광도가 1.405이었으나, *S. mutans*와 4주의 분리균주 혼합 배양시에는 각각의 흡광도가 0.855, 0.867, 0.797, 1.083으로 감소되었다.
4. 비커 와이어 검사 결과, *S. mutans* 단독 배양시 형성된 인공치태의 평균 무게는 1566 ± 103 mg이었다. *S. mutans*와 4주의 분리균주 혼합 배양시에는 각각 44 ± 5 mg, 41 ± 12 mg, 34 ± 7 mg, 38 ± 12 mg으로 현저히 감소되었다. 배양후 생균수는 *S. mutans* 단독 배양시 ml당 2.0×10^9 이었으나, *S. mutans*와 4주의 분리균주 혼합 배양시 *S. mutans*는 2.0×10^7 내지 6.0×10^7 으로 감소되었다.
5. *S. oralis* 단독 배양시 ml당 2.1×10^8 이었으나, *S. oralis*와 4주의 분리균주 혼합 배양시 *S. oralis*는 1.4×10^7 내지 7.0×10^7 으로 감소되었다.
6. 3주의 분리균주로 부터 약 60 kb의 plasmid를 분리할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면 구강에서 분리된 *E. durans*는 *S. mutans*의 증식을 억제하여 인공치태 형성을 저지하였고, *S. oralis*의 증식은 약간 억제하였다.

주요어 : *Enterococcus durans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*

I. 서론

치아우식증은 전세계적으로 가장 빈발하는 구강내 만성 감염성 질환이다. 치아우식증 발생에 치태가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 이는 치태에 존재하는 세균들이 여러 가지 해로운 대사산물을 만들기 때문이다¹⁾. 1924년 Clarke²⁾가 최초로 치태로부터 *Streptococcus*를 분리하여 *S. mutans*라 명명한 이래, 치아우식증의 발생에 있어서 가장 중요한 원인균으로 여겨지고 있다³⁻⁵⁾.

*S. mutans*는 세균 외부로 glucosyltransferase를 분비하여 자당으로부터 점착성의 비수용성 다당류인 글루칸 (glucan)을 합성한다. 이 글루칸은 치태의 기본물질이 되어 *S. mutans*의 글루칸 수용체와 결합하여 치아 표면에 부착되도록 도와 준다. 치

태내의 *S. mutans*는 탄수화물의 대사과정을 통하여 다량의 유산을 생성하여 치아 표면을 탈회시켜 치아우식증이 유발된다⁶⁾.

*S. mutans*가 구강내 치태를 형성하는 동안 *S. oralis*을 위시한 구강내 일부 세균들은 *S. mutans*의 증식을 억제함으로써 치태 형성을 저지하는 역할을 하게 된다^{7,8)}.

*S. mutans*에 의한 치아우식증을 예방하기 위하여 chlorhexidine이나 iodine과 같은 소독제의 치면 도포, chlorhexidine 양치, 경구용 penicillin요법, vancomycin과 kanamycin의 국소도포, 불소함유제의 도포 및 양치 등이 연구되어 왔으나⁹⁻¹⁹⁾, 장기적인 효과는 기대할 수 없었다.

정상적으로 존재하는 구강내 상주균을 이용하여 치아우식증을 예방하고자 하는 대치요법에 대한 연구가 되고 있다²⁰⁻²⁵⁾. 이러한 연구의 시작은 효과적인 대치 세균을 분리하는데 있다. *S.*

*mutans*의 돌연변이종으로 세포내 탄수화물 대사에 결함이 있거나²²⁾, lactate dehydrogenase 활성이 부족하여²⁰⁾ 유산을 생성하지 못하는 세균은 치아우식 활성이 낮다는 것이 입증되었고, *S. mutans*처럼 치면에 집락을 이루고 치태를 형성하나 치아우식증을 일으키지 않는 *S. salivarius*도 분리되었다^{23,24)}. 또한 구강내 *Enterococcus faecalis*는 항균제 기능을 나타내는 bacteriocin을 생성함으로써 연쇄상구균의 증식을 억제하기 때문에 대치 세균으로의 가능성이 있는 것으로 보고되고 있다²⁶⁾.

장구균 (*Enterococcus*)은 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 있으며, 연쇄상구균속으로 분류되었으나, 요사이는 독립된 속으로 분류하고 있다. 대부분의 장구균은 병원성 세균으로 문제시 되고 있으나, 장구균은 인체에서 정상적으로 존재하며 건강한 사람에서 치은 열구의 총 미생물 중 7.7%를 차지할 정도로²⁷⁾ 구강에 잘 생존한다. 장구균중 *E. durans*는 구미에서 옛날부터 유산균 식품에 사용되는 비병원성 세균으로 간주되어 왔다.

본 연구에서는 아동의 구강에서 분리한 장구균의 생화학적 특성을 검사하여 *E. durans*를 분리하여 항생제 감수성 검사를 하였고 치아우식증의 발생에 중요한 *S. mutans*의 치태형성 및 증식에 미치는 영향을 보았으며, *S. mutans* 증식을 억제하는 세균중 대표적인 세균인 *S. oralis*의 생균수에 대한 영향을 보았다. 또한 *S. mutans*을 억제하는 bacteriocin이 plasmid에 의해 생산되는가를 보기 위하여 분리균주에서 plasmid를 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 장구균의 분리

본 실험에 사용된 장구균은 4~6세의 유치원 아동의 타액으로 부터 분리하였다. 장구균을 분리하기 위하여 검체를 6.5% NaCl이 함유된 Brain heart infusion agar (BHI, Difco, Detroit, MI, U.S.A.)에 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 후, 집락을 형성한 균주를 bile-esculin 고체 배지에 도말 접종하였다. 이것을 37°C에서 24시간 배양한 후 검정 색소를 생산하는 집락을 선택하였다.

2. 장구균의 동정

검체로부터 분리된 세균의 형태학적, 생물학적, 생화학적 성질 등은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 있는 방법으로 검사하였다. 이들 균주는 6.5% NaCl이 함유된 BHI broth에 배양한 후 glycerol의 최종농도가 20% (w/v) 되도록 첨가하여 -70°C에 냉동보관하면서 필요에 따라 재접종, 배양한 후 실험에 사용하였다.

1) API 20S kit를 이용한 검사

단일 집락만을 증류수에 현탁해서 BHI 고체배지 상에서 37°C에서 24시간 배양하였다. 멸균된 면봉으로 증식된 세균을 취해서 증류수에 현탁하여 Macfarland scale #5로 조정하였는데, 이는 분광 광도계 550 nm에서의 흡광도 1.5와 같았다. 세균의 탁도를 조정한 후 API 20S kit (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)에 세균액을 접종하고 37°C에서 4시간 배양하였다. 반응액을 첨가해서 기질의 색깔 변화와 당의 산성화를 관찰하였다. 정확한 동정을 위해 24시간 후 재판독하였다.

2) 탄수화물 발효 검사 (Carbohydrate fermentation test)

Phenol red base broth에 arabinose, glycogen, inulin, lactose, mannitol, melizitose, melibiose, raffinose, rhamnose, ribose, sorbitol, starch 및 trehalose의 최종 농도가 0.5% 되도록 첨가하였다. 이 broth에 균주를 접종한 후 배지의 색깔이 황색으로 변한 것을 양성으로 하였다.

3. 항생제 감수성 검사

항생제 감수성 검사에는 erythromycin, penicillin, tetracycline, vancomycin, ampicillin, teicoplanin, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, kanamycin 및 streptomycin을 사용하였다. 항생제 검사 결과 판정은 미국 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard)의 기준에 준하였다.

4. 일회용 큐벤에서의 비수용성 글루칸 형성 억제실험

BHI broth에 0.5% 효모추출액 (yeast extract)과 5% 자당을 첨가한 후 (BHIYS broth), TES (N-tris (Hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane-sulfonic acid; 2-((2-Hydroxy-1,1-bis (hydroxymethyl)ethyl)amino)ethane sulfonic acid, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) buffer 농도가 0.1 M이 되도록 조정하였다. 그 3 ml를 일회용 큐벤에 넣고 50 µl의 *E. durans* 배양액과 50 µl의 *S. mutans* (Ingbritt strain) 배양액을 접종하였다. 대조군에서는 *S. mutans* 배양액만 접종하였다. 이것을 탄산가스 배양기안에 수평면에 대하여 30° 각도로 설치하고 37°C에서 2일간 배양하였다. 내용물을 제거하고 4 ml의 증류수로 세척한 후, 3 ml의 증류수를 가하여 분광광도계 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이것을 3회 반복하여 측정한 후 평균을 구하였다.

5. *E. durans*가 *S. mutans*의 인공 치태 형성과 생균수에 미치는 영향

BHIYS broth에 0.1 M TES buffer를 첨가하여 pH를 8로 조정한다 다음, 비커에 40 ml씩 준비하였다. 여기에 *S. mutans*와 *E. durans* 표준균주 (ATCC 6056, Rockville, MD, U.S.A.)

또는 *E. durans* 분리균주를 각각 2×10^8 씩 접종하고 0.016 inch 스테인레스스틸 재질의 고정용 wire (Ormco, Glendora, CA, U.S.A.)를 50 mg 내외가 되게 준비하여 3 개씩 비커에 매달아 배지에 잠기도록 하였다. 대조군에서는 *S. mutans*만 접종하였다. 37°C 탄산가스 배양기에서 회전시키면서 15시간 배양한 후, 3 개의 wire 상에 형성된 인공 치태의 무게를 평균하였다. 동시에 세균배양액을 회석하여 BHI agar상에 접종하여 37°C 탄산가스 배양기에서 18시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

6. *E. durans*가 *S. oralis*의 생균수에 미치는 영향

BHIYS broth에 0.1M TES buffer를 첨가하여 pH를 8로 조정한 다음, 그 1 ml에 *E. durans*와 *S. oralis* 배양액 각각 0.01 ml를 접종하였다. 37°C 탄산가스 배양기에서 15시간 배양한 후, 세균배양액을 회석하여 BHI agar상에 접종하고 37°C 탄산가스 배양기에서 18시간 배양한 후 생균수를 산정하였다.

7. *E. durans*로 부터 plasmid 검출

*S. mutans*을 억제하는 bacteriocin이 분리균주의 plasmid에 의하는지를 보기 위하여 Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 분리균주로부터 plasmid를 분리하였다. 5 ml의 세균 배양액을 10,000×g로 10분간 원심하여 상청액을 버렸다. 여기에 300 µl의 세포부유액을 넣어 1.5 ml 시험관에 옮겼다. 여기에 300 µl의 세포용해액을 가하여 섞었다. Minicolumn에 주사기를 연결하고 1 ml의 resin액을 넣고 세포용해액을 주사기에 넣어 주사기 피스톤으로 천천히 밀어 넣었다. 다시 2 ml의 세척액을 가하고 10,000×g로 2분간 원심하였다. 1.5 ml 시험관에 minicolumn을 옮기고 50 µl의 증류수를 가한 다음, 10,000×g로 20초간 원심하여 plasmid DNA를 얻었다. *E.*

durans 분리균주 네주 각각의 DNA 4 ng에 6×gel loading buffer (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol/50% glycerol)를 가하여 1 µg/ml ethidium bromide를 가한 1% agar gel에 부하 (loading)하였다. 동시에 DNA size marker로서 lambda DNA/Hind III를 부하하였다. 이를 전기영동을 실시한 다음, UV photographic apparatus (Polaroid, Cambridge, MA, U.S.A.)를 사용하여 촬영하였다.

III. 성 적

1. *E. durans*의 당발효 및 생화학적 특성

API 20S kit를 사용하여 동정된 *E. durans* 분리균주 네주를 각각 *E. durans* -1, -2, -3, -4로 표기하였으며, 당 발효 검사를 실시한 결과 (Table 1), 분리균주 모두 lactose, ribose, starch, trehalose를 분해하고 arabinose, glycogen, inulin, mannitol, melezitose, raffinose, rhamnose 및 sorbitol은 분해하지 못하였다. Melibiose에 대해서는 *E. durans*-1을 제외한 세주가 분해하였다. 생화학적 검사를 실시한 결과 (Table 2), Voges-Proskauer 검사, hippurate 분해 검사, β-glucosidase 검사, pyrrolidonylarylamidase 검사, β-galactosidase 검사, leucine arylamidase 검사 및 arginin dehydrolase 검사에서 분리균주 모두 양성을 보였고, β-glucuronidase 검사와 alkaline phosphatase 검사에는 모두 음성을 보였다. α-galactosidase 검사에는 *E. durans*-2에서만 양성을 보였다. 이상의 결과에서 분리균주들은 대체적으로 비슷한 양상을 보였다.

2. 항생제 감수성 검사

E. durans 분리균주 모두 erythromycin, penicillin, tobramycin, ampicillin, teicoplanin, ciprofloxacin, van-

Table 1. Carbohydrate fermentation of isolated *E. durans*

	<i>E. durans</i> -1	<i>E. durans</i> -2	<i>E. durans</i> -3	<i>E. durans</i> -4
Arabinose	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-
Melibiose	-	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-
Starch	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+

Table 2. Biochemical characteristics of isolated *E. durans*

	<i>E. durans</i> -1	<i>E. durans</i> -2	<i>E. durans</i> -3	<i>E. durans</i> -4
VP	+	+	+	+
HIP	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+
PYRA	+	+	+	+
αGAL	-	+	-	-
βGUR	-	-	-	-
βGAL	+	+	+	+
PAL	-	-	-	-
LAP	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+

VP : Acetoin production HIP : Hippurate hydrolysis
 ESC : β-glucosidase PYRA : Pyrrolidonylarylamidase
 αGAL : α-galactosidase βGUR : β-glucuronidase
 βGAL : β-galactosidase PAL : Alkaline phosphatase
 LAP : Leucine arylamidase ADH : Arginin dehydrolase

Table 3. Antibiotic susceptibility of isolated *E. durans*

	<i>E. durans-1</i>	<i>E. durans-2</i>	<i>E. durans-3</i>	<i>E. durans-4</i>
Erythromycin	+	+	+	+
Penicillin	+	+	+	+
Tobramycin	+	+	+	+
Ampicillin	+	+	+	+
Teicoplanin	+	+	+	+
Ciprofloxacin	+	+	+	+
Vancomycin	+	+	+	+
Gentamicin	+	+	+	+
Kanamycin	+	+	+	+
Streptomycin	+	+	+	+

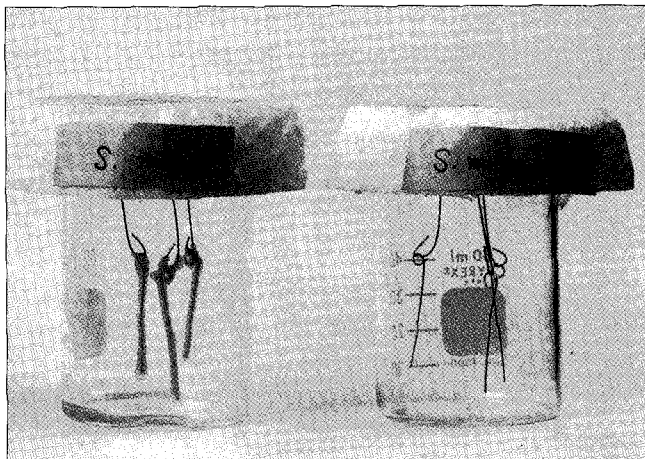


Fig. 1. Typical photograph of artificial plaque formation on the orthodontic wires by *S. mutans*. The stainless steel wires weighing about 50 mg were incubated in BHI broth containing 0.5% yeast extract and 5% sucrose for 15 hours.

comycin, gentamicin, kanamycin 및 streptomycin에 대해 감수성을 보였다 (Table 3).

3. 일회용 큐벳에서의 비수용성 글루칸 형성 억제

S. mutans 단독 배양시에는 분광광도계의 파장 550 nm에서 흡광도가 1.405이었으나, *S. mutans*와 *E. durans* 분리균주의 혼합 배양시에는 각각의 흡광도가 0.855, 0.867, 0.797, 1.083으로 작게 나타나 (Table 4), 비수용성 글루칸 형성이 억제됨을 알 수 있었다.

4. *E. durans*가 *S. mutans*의 인공치태 형성과 생균수에 미치는 영향

비커 와이어 검사 (Fig. 1)에서 *S. mutans* 단독 배양시 형성된 인공치태 무게는 1566±103mg이었다. *S. mutans*와 *E. durans* 표준균주 혼합 배양시에는 323±5mg이었으나, *S. mutans*와 *E. durans* 분리균주의 혼합 배양시에는 44±5mg, 41±12

Table 4. Inhibitory activity of isolated *E. durans* on the production of water-insoluble glucan in disposable cuvette

Test bacterial strains	Optical density (550 nm)
<i>S. mutans</i>	1.405
<i>E. durans-1</i> + <i>S. mutans</i>	0.855
<i>E. durans-2</i> + <i>S. mutans</i>	0.867
<i>E. durans-3</i> + <i>S. mutans</i>	0.797
<i>E. durans-4</i> + <i>S. mutans</i>	1.083

Table 5. Inhibitory activity of isolated *E. durans* on the formation of artificial plaque on the orthodontic wires

Test bacterial strains	Plaque weight±S.D. (mg)
<i>S. mutans</i>	1566±103
<i>E. durans-S*</i>	32±9
<i>E. durans-1</i>	22±6
<i>E. durans-2</i>	35±3
<i>E. durans-3</i>	30±3
<i>E. durans-4</i>	22±13
<i>E. durans-S</i> + <i>S. mutans</i>	323±5
<i>E. durans-1</i> + <i>S. mutans</i>	44±5
<i>E. durans-2</i> + <i>S. mutans</i>	41±12
<i>E. durans-3</i> + <i>S. mutans</i>	34±7
<i>E. durans-4</i> + <i>S. mutans</i>	38±12

**E. durans-S*: Standard *E. durans* (ATCC 6056)

mg, 34±7mg, 38±12mg으로 현저히 감소되었다 (Table 5).

배양 후 생균수 검사를 한 결과, *S. mutans* 단독 배양시에는 ml당 2.0×10⁹이었고, *E. durans* 분리균주 단독 배양시에는 각각 2.4×10⁹, 2.8×10⁹, 2.4×10⁹, 3.5×10⁹이었다. *S. mutans*와 *E. durans* 분리균주의 혼합 배양시에는 *S. mutans*는 2.0×10⁷ 내지 6.0×10⁷으로 감소하였으며, *E. durans* 분리균주는 각각 7.8×10⁸, 8.3×10⁸, 9.0×10⁸, 16.8×10⁸으로 감소하였다 (Table 6).

5. *E. durans*가 *S. oralis*의 생균수에 미치는 영향

S. oralis 단독 배양시에는 ml당 2.1×10⁸이었고, *E. durans* 분리균주 단독 배양시에는 각각 8.6×10⁸, 8.8×10⁸, 14.4×10⁸, 8.0×10⁸이었다. *S. oralis*와 *E. durans* 분리균주의 혼합 배양시에는 *S. oralis*는 1.4×10⁷ 내지 7.0×10⁷으로 감소하였으며, *E. durans* 분리균주는 각각 8.4×10⁸, 10.6×10⁸, 9.9×10⁸, 9.7×10⁸으로 비슷하였다 (Table 7).

Table 6. Inhibitory activity of isolated *E. durans* on the replication of *S. mutans*

Test bacterial strains	Viable cell count (/ml)	
	<i>S. mutans</i>	<i>E. durans</i>
<i>S. mutans</i>	2.0×10^9	
<i>E. durans-S*</i>		0.5×10^9
<i>E. durans-1</i>		2.4×10^9
<i>E. durans-2</i>		2.8×10^9
<i>E. durans-3</i>		2.4×10^9
<i>E. durans-4</i>		3.5×10^9
<i>E. durans-S + S. mutans</i>	0.3×10^7	0.3×10^8
<i>E. durans-1 + S. mutans</i>	2.2×10^7	7.8×10^8
<i>E. durans-2 + S. mutans</i>	5.0×10^7	8.3×10^8
<i>E. durans-3 + S. mutans</i>	6.0×10^7	9.0×10^8
<i>E. durans-4 + S. mutans</i>	2.0×10^7	16.8×10^8

**E. durans-S*; Standard *E. durans* (ATCC 6056)

Table 7. Inhibitory activity of isolated *E. durans* on the replication of *S. oralis*

Test bacterial strains	Viable cell count (/ml)	
	<i>S. oralis</i>	<i>E. durans</i>
<i>S. oralis</i>	2.1×10^8	
<i>E. durans-S*</i>		4.7×10^8
<i>E. durans-1</i>		8.6×10^8
<i>E. durans-2</i>		8.8×10^8
<i>E. durans-3</i>		14.4×10^8
<i>E. durans-4</i>		8.0×10^8
<i>E. durans-S + S. oralis</i>	2.2×10^7	7.6×10^8
<i>E. durans-1 + S. oralis</i>	2.8×10^7	8.4×10^8
<i>E. durans-2 + S. oralis</i>	4.0×10^7	10.6×10^8
<i>E. durans-3 + S. oralis</i>	7.0×10^7	9.9×10^8
<i>E. durans-4 + S. oralis</i>	1.4×10^7	9.7×10^8

**E. durans-S*; Standard *E. durans* (ATCC 6056)

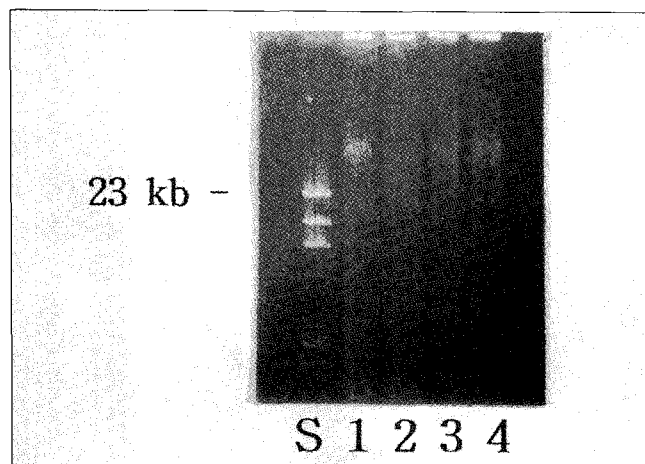


Fig. 2. Plasmid isolated from *E. durans*. DNA of lane 1, 2, 3, and 4 was extracted from *E. durans-1*, -2, -3, and -4, respectively, using Wizard™ Plus Minipreps DNA purification system kit. Lane S was DNA size marker of lambda DNA/Hind III.

6. *E. durans*로 부터 분리된 plasmid의 전기영동 검사

E. durans-1, -3, -4에서 약 60 kb의 plasmid band를 볼 수 있었다 (Fig. 2).

IV. 고 찰

치태는 치아우식증 발생에 있어서 가장 중요한 역할을 하며, 세균과 비세포성 물질로 구성되어 있다^{28,29}. 치태 형성과정을 보면 타액에서 유래되는 당단백이 범랑질 표면에 흡착되어 획득피막을 형성하고 여기에 여러 세균들이 부착하여 증식하게 됨으로서 치태가 형성된다. 치아우식증의 주원인균으로 알려진 *S. mutans*는 세균 외부로 glucosyltransferase를 분비하여 자당으로부터 비수용성 글루칸인 뮤탄을 합성하게 되어 치태의 형성에 기여하게 된다. Chlorhexidine^{1,11,12}, iodine¹⁰, peni-

cillin¹³, vancomycin¹⁴⁻¹⁷, kanamycin¹⁸, 불소¹⁹ 등으로 *S. mutans*를 억제하여 치아우식 활성을 감소시킬 수 있으나 그 효과는 지속적이지 못하였다. 최근 구강내 정상적으로 존재하는 세균을 이용하여 치아 질환을 예방하고자 하는 연구가 이루어지고 있다²⁰⁻²⁵. 대치 세균은 비병원성이면서 구강에서 지속적으로 증식하여 병원체와 접촉하였을 때, 병원체의 증식이나 그 작용을 억제할 수 있어야 한다. 이론적으로 통상의 치료 방법과 비교하여 이러한 대치 방법은 대치 세균의 간단한 접종으로 대치 세균의 지속적인 작용을 기대할 수 있으며, 자연적인 전염을 통해 대중 집단의 질병 예방 효과도 얻을 수 있다는 장점이 있다³⁰. 치아우식증 예방에 이용될 수 있는 대치 세균은 치태 형성에 주된 역할을 하는 *S. mutans*를 억제하거나, *S. mutans*의 치태 형성을 억제하여야 한다.

장구균은 대장균이나 포도상 구균 등과 함께 병원 감염성 세균으로 그 중요성이 부각되고 있다. 요도 감염이 가장 많고 패혈증, 창상감염 및 심내막염 등의 감염증을 유발한다. 임상 가검물에서 가장 많이 분리되는 장구균은 *E. faecalis*이며 다음으로 *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*의 순이다³¹. 장구균의 동정에는 생화학적인 특성을 이용하여 동정하는 API 20S kit나 Microscan system 등이 이용되고 있다³². 최근 항생제 내성 세균의 출현으로 항생제 내성 유전자를 이용한 중합효소 연쇄반응과 DNA 접합법이 장구균의 동정에 이용되고 있다^{33,34}.

장구균에 사용되는 약제에 대한 저항성을 나타내는 세균이 증가하여 그 치료가 점점 어려워지고 있다³⁵. 특히 문제가 되고 있는 것은 vancomycin과 aminoglycoside에 대해 고도의 내성을 나타내는 장구균의 출현이다³⁶. 그래서 장구균 감염 치료시 감염부위로 부터 분리된 장구균의 정확한 항생제 감수성 양상을 검사하여야 한다^{37,38}. 장구균속의 종 (species)에 따라서는 임상중세, 약제에 대한 감수성 및 사망률 등에 있어 차이를 나타낸다³⁹. Gold 등⁴⁰은 검사 대상자의 60~75%에서 타액, 치태, 구강전정점막, 설배면으로부터 장구균을 분리하였으며 *E. faecalis*를 가장 많이 분리하였다고 보고하였다. Nord과

Wadstrom은 근관성 치주염과 치수염을 가진 환자로 부터 장구균을 분리하여 *E. faecalis*가 근관 감염에 중요한 역할을 하며, 이것에 감염된 근관은 예후가 불량하다고 하였다⁴¹⁾. 그래서 본 연구에서는 비병원성 세균으로 분류되는 *E. durans*를 선택하여 연구하였다. *E. durans*의 항생제 감수성 검사 결과, 검사에 사용된 erythromycin, penicillin, tobramycin, ampicillin, teicoplanin, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, kanamycin 및 streptomycin에 대해 모두 감수성을 보였다. 이와 같은 결과는 최근 장구균이 항생제에 대한 내성이 증가하고 있다는 보고³⁵⁾와는 다르다. 이는 vancomycin 내성 균주가 분리된 사람을 임상적으로 살펴본 결과 기저질환이 있는 경우가 많았다는 보고⁴²⁾를 고려해 볼 때, 검체의 종류 및 피검자의 임상적 상태에 따른 차이라고 생각된다. 본 연구에서 타액을 채취한 아동들은 임상적으로 건강한 상태이었다.

장구균의 병원성 인자는 일반적으로 plasmid에 의해 유래되고 있는데 이를 3가지로 분류할 수 있다. 첫째, 용혈소의 생성이다. 건강한 사람의 대변이나 구강에서 분리되는 세균보다 창상부위에서 분리되는 세균에서 용혈소를 많이 만든다. 둘째, bacteriocin의 생성이다^{26,43)}. 그람 양성 세균에 대해 항균작용을 나타내고 있다. 셋째, superoxide ion의 생성이다⁴⁴⁾. 산소의 환원으로 생성되는 superoxide ion은 어떤 조건하에서는 hydroxyl radical과 같은 강력한 산화제로 작용할 수 있다.

일회용 큐벳에서의 비수용성 글루칸 형성 억제 실험에서 *S. mutans* 단독 배양시와 비교하여 *S. mutans*와 *E. durans* 혼합 배양시 글루칸 형성이 억제되었고, 비커 와이어 검사에서 *S. mutans* 단독 배양시 형성된 인공치태의 무게 $1566 \pm 103\text{mg}$ 에 비교하여 *S. mutans*와 *E. durans* 표준균주 혼합 배양시 $323 \pm 5\text{mg}$, *S. mutans*와 *E. durans* 분리균주를 각각 혼합 배양시 $44 \pm 5\text{mg}$, $41 \pm 12\text{mg}$, $34 \pm 7\text{mg}$, $38 \pm 12\text{mg}$ 으로 현저히 감소되었다. 이와 같은 결과는 *S. mutans*의 인공 치태 형성을 *E. durans*가 억제하는 것을 보여 주었다. 이와 같은 결과는 혼합배양 후, 생균수를 비교함으로써 그 원인을 알 수 있다. *S. mutans* 단독 배양시 ml당 생균수가 2.0×10^9 이었으나, *S. mutans*와 *E. durans* 혼합 배양시 *S. mutans*의 ml당 생균수가 2.0×10^7 내지 6.0×10^7 으로 감소하였다. 즉 *S. mutans*의 증식이 억제되어 치태 형성이 저지되었다고 말할 수 있다. 또한 과산화수소를 분비하여 *S. mutans*의 증식을 억제한다고 알려진 *S. oralis*⁴⁵⁾에 대해서도 *E. durans*의 억제작용이 약간 있다 (Table 7). 이러한 결과는 장구균이 그람 양성 세균에 대해 넓은 범위의 항균작용을 나타낸다는 여러 연구 결과와 일치한다. Brock 등⁴⁶⁾과 Jackson⁴⁷⁾은 *E. faecalis*의 bacteriocin이 많은 종류의 그람 양성 구균에 대해 항균작용을 나타낸다고 보고하였으며, Jett와 Gilmore는 *E. faecalis*에 의해 분비된 bacteriocin에 의해 *S. sorbrinus*를 제외한 구강내 모든 streptococci가 억제됨으로써 구강내 미생물 생태계가 변화될 수 있다고 하였다²⁶⁾. 또한 이 bacteriocin은 약 60kb의 plasmid에 의해 만들어진다고 하였다. 본 연구에서도 3주의 분리균주에서 약 60kb의 plasmid를

볼 수 있었으나 (Fig. 2), *E. durans*-2에서는 plasmid를 볼 수 없어 *S. mutans*에 대한 억제 기전에 대해서는 추후 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다. Hillman과 Socransky은 *E. faecalis*가 생산하는 bacteriocin이 치아우식증을 일으키는 streptococci를 억제함으로써 치아우식증 예방을 위한 대치 세균으로 가치가 있다고 하였다³⁰⁾.

이상의 결과로 볼 때, *E. durans*는 *E. faecalis*처럼 bacteriocin을 분비하여 *S. mutans*의 증식을 억제함으로써 치태 형성에 중요한 글루칸 형성을 감소시켜 치아우식증의 발생을 억제하는 것으로 사료된다. 그러나 *E. durans*가 현저하지는 않지만 *S. oralis*의 증식도 억제하는 만큼 구강에서의 *E. durans*의 장기적인 효과에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

V. 결 론

구강에서 분리된 *E. durans* 분리균주 4주의 특성과 *S. mutans*와 *S. oralis*에 대한 작용을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리균주에 대한 당 발효 검사와 생화학적 검사 결과, 비슷한 양상을 보였다.
2. 분리균주 모두 erythromycin, penicillin, tobramycin, ampicillin, teicoplanin, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, kanamycin 및 streptomycin에 대해 감수성을 보였다.
3. *S. mutans*를 일회용 큐벳에서 단독 배양시 550nm에서의 흡광도가 1.405이었으나, *S. mutans*와 4주의 분리균주 혼합 배양시에는 각각의 흡광도가 0.855, 0.867, 0.797, 1.083으로 감소되었다.
4. 비커 와이어 검사 결과, *S. mutans* 단독 배양시 형성된 인공치태의 평균 무게는 $1566 \pm 103\text{mg}$ 이었다. *S. mutans*와 4주의 분리균주 혼합 배양시에는 각각 $44 \pm 5\text{mg}$, $41 \pm 12\text{mg}$, $34 \pm 7\text{mg}$, $38 \pm 12\text{mg}$ 으로 현저히 감소되었다. 배양후 생균수는 *S. mutans* 단독 배양시 ml당 2.0×10^9 이었으나, *S. mutans*와 4주의 분리균주 혼합 배양시 *S. mutans*는 2.0×10^7 내지 6.0×10^7 으로 감소되었다.
5. *S. oralis* 단독 배양시 ml당 2.1×10^8 이었으나, *S. oralis*와 4주의 분리균주 혼합 배양시 *S. oralis*는 1.4×10^7 내지 7.0×10^7 으로 감소되었다.
6. 3주의 분리균주로 부터 약 60 kb의 plasmid를 분리할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면 구강에서 분리된 *E. durans*는 *S. mutans*의 증식을 억제하여 인공치태 형성을 저지하였고, *S. oralis*의 증식은 약간 억제하였다.

참 고 문 헌

1. 박기철 : 치아플렉(2). 치과연구 43:23-30, 1998.
2. Clarke JK : On the bacterial factor in the etiology of

- dental caries. Br J Exp Pathol 5:141-147, 1924.
3. Gibbons RJ, van Houte J : Dental caries. Ann Rev Med 26:121-136, 1975.
 4. Loesche WJ : Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev 9:65-107, 1976.
 5. Hamada S, Slade HD : Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44:331-384, 1980.
 6. Tanzer JM : Contemporary oral microbiology and immunology. Microbiology of dental caries. Mosby pp 377-424, 1992.
 7. Lumikari M, Soukka T, Nurmiö S, et al. : Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase system in human saliva. Arch Oral Biol 36:155-160, 1991.
 8. 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.
 9. Emilson CG : Effect of chlorhexidine gel treatment on *Streptococcus mutans* population in human saliva and dental plaque. Scand J Dent Res 89:239-246, 1981.
 10. Caufield PW, Gibbons RJ : Suppression of *Streptococcus mutans* in the mouths of humans by a dental prophylaxis and topically-applied iodine. J Dent Res 58:1317-1326, 1979.
 11. Schaeken MJM, de Haan P : Effects of sustained-release chlorhexidine acetate on the human dental plaque flora. J Dent Res 68:119-123, 1989.
 12. Mikkelsen L, Jensen SB, Schi tt CR, et al. : Classification and prevalences of plaque streptococci after two years oral use of chlorhexidine. J Periodont Res 16:645-658, 1981.
 13. Maltz M, Zickert I : Effect of penicillin on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and lactobacilli in hamsters and in man. Scand J Dent Res 90:193-199, 1982.
 14. DePaola PF, Jordan HV, Berg J : Temporary suppression of *Streptococcus mutans* in humans through topical application of vancomycin. J Dent Res 53:108-114, 1974.
 15. Jordan HV, Depaola PF : Effect of a topically applied 3% vancomycin gel on *Streptococcus mutans* on different tooth surfaces. J Dent Res 53:115-120, 1974.
 16. Jordan HV, Depaola PF : Effect of a prolonged application of vancomycin on human oral *Streptococcus mutans* populations. Arch Oral Biol 22:193-197, 1977.
 17. Depaola PF, Jordan HV, Soparkar PM : Inhibition of dental caries in school children by topically applied vancomycin. Arch Oral Biol 22:187-191, 1977.
 18. Loesche WJ, Bradbury DR, Woolfolk MP : Reduction of dental decay in rampant caries individuals following short-term kanamycin treatment. J Dent Res 56:254-265, 1977.
 19. Woods R : The short-term effect of topical fluoride applications on the concentration of *Streptococcus mutans* in dental plaque. Aust Dent J 16:152-155, 1971.
 20. Hillman JD : Lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*: Isolation and preliminary characterization. Infect Immun 21:206-212, 1978.
 21. Mao M, Rosen S : Cariogenicity of a "low-acid" mutant of *Streptococcus mutans*. IADR Progr & Abstr 57:No. 787, 1978.
 22. Tanzer JM, Freedman ML : Genetic alterations of *Streptococcus mutans*' virulence. Adv Exp Med Biol 107:661-672, 1978.
 23. Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J : Competitive displacement of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* TOVE-R. Infect Immun 48:44-50, 1985.
 24. Tanzer JM, Kurasz AB, Clive J : Inhibition of ecological emergence of mutans streptococci and inhibition of tooth decay by *Streptococcus salivarius* TOVE-R infection. Infect Immun 49:76-83, 1985.
 25. Abhyankar S, Sandham HJ, Chan KH : Serotype C *Streptococcus mutans* mutable to lactate dehydrogenase deficiency. J Dent Res 64:1267-1271, 1985.
 26. Jett BD, Gilmore MS : The growth-inhibitory effect of the *Enterococcus faecalis* bacteriocin encoded by pAD1 extends to the oral streptococci. J Dent Res 69:1640-1645, 1990.
 27. Socransky SS : Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res 49:203-222, 1970.
 28. McDougall WA : Studies on the dental plaque I : The histology of the dental plaque and its attachment. Aust Dent J 8:261-273, 1963.
 29. McDougall WA : Studies on the dental plaque II : The histology of the developing interproximal plaque. Aust Dent J 8:398-407, 1963.
 30. Hillman JD, Socransky SS : Replacement therapy

- for the prevention of dental disease. *Adv Dent Res* 1:119-125, 1987.
31. Mollerach ME, Partoune P, Coyette J, et al. : Importance of the E-46-D-160 polypeptide segment of the non-penicillin-binding module for the folding of the low affinity, multimodular class B penicillin-binding protein 5 of *Enterococcus hirae*. *J Bacteriol* 178:1774-1775, 1996.
 32. Tenover FC, Tokars J, Swenson J, et al. : Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 31:1695-1699, 1993.
 33. Donabedian S, Chow JW, Shlaes DM, et al. : DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of enterococci to the species level. *J Clin Microbiol* 33:141-145, 1995.
 34. Swenson J.M, Clark NC, Ferraro MJ, et al. : Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 32:1700-1704, 1994.
 35. Vandamme P, Vercauteren E, Lammens C, et al. : Survey of enterococcal susceptibility patterns in Belgium. *J Clin Microbiol* 34:2572-2576, 1996.
 36. Mackowiak PA : The enterococci : Evidence of species-specific clinical and microbiologic heterogeneity. *Am J Med Sci* 297:238-243, 1989.
 37. Watanakunakorn C, Patel R : Comparison of patients with enterococcal bacteremia due to strains with and without high-level resistant to gentamicin. *Clin Infect Dis* 17:74-78, 1993.
 38. Willey BM, Kreiswirth BN, Simor AE, et al. : Detection of vancomycin resistance in *Enterococcus species*. *J Clin Microbiol* 30:1621-1624, 1992.
 39. Mackey T, Lejeune V, Janssens M, et al. : Identification of vancomycin-resistant lactic bacteria isolated from human. *J Clin Microbiol* 31:2499-2501, 1993.
 40. Gold OG, Jordan HV, van Houte J : The prevalence of enterococci in the mouth and their pathogenicity in animal models. *Arch Oral Biol* 20:473-477, 1975.
 41. Nord C, Wadstrom T : Characterization of hemolytic enterococci isolated from oral infections. *Acta Odontol Scand* 31:387-393, 1973.
 42. 백경란, 김성민, 이남용 등 : Vancomycin 내성 장구균의 소화관 집락양상. *감염* 28:245-251, 1996.
 43. Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, et al. : Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 encoded cytolytic toxin system and its relationship to antibiotic determinants. *J Bacteriol* 176:7335-7344, 1994.
 44. Huycke MM, Joyce W, Wack MF : Augmented production of extracellular superoxide by blood isolated of *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis* 173:743-746, 1996.
 45. 김선미 : *Streptococcus oralis*의 인공치태 억제 효과에 대한 연구. (전남대학교 박사학위논문) 1998.
 46. Brock TD, Peacher B, Pierson D : Survey of the bacteriocines of enterococci. *J Bacteriol* 86:702-707, 1963.
 47. Jackson RW : Bacteriolysis and inhibition of Gram-positive bacteria by components of *Streptococcus zymo-*

Abstract

INTERACTION OF ORAL *ENTEROCOCCUS DURANS*
WITH *STREPTOCOCCUS MUTANS* AND *STREPTOCOCCUS ORALIS*

Yong-Nam Kim, Kyu-Ho Yang, Jong-Suk Oh*, Jin Chung**

*Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry,
Department of Microbiology, College of Medicine*, Chonnam National University
Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Pusan National University***

Enterococcus is a normal inhabitant of the human oral cavity, the vagina, and the gastrointestinal tract. Four isolates of *Enterococcus* in this study were identified as *E. durans*. These bacteria were characterized and the interaction of these bacteria with the important oral bacteria as like *S. mutans* and *S. oralis* was studied as follows.

1. The carbohydrate fermentation test and biochemical test showed similar results in 4 isolates.
2. The susceptibility test against erythromycin, penicillin, tobramycin, ampicillin, teicoplanin, ciprofloxacin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, and streptomycin showed to be susceptible in all four isolates.
3. The optical density of absorbance at 550 nm was 1.405 in the culture of *S. mutans* in disposable cuvette, whereas being 0.855, 0.867, 0.797, and 1.083 in the combined culture of *S. mutans* and each *E. durans*.
4. The mean weight of produced artificial plaque on the wires in the beaker was 1566 ± 103 mg in culture of *S. mutans* only, whereas being reduced to 44 ± 5 mg, 41 ± 12 mg, 34 ± 7 mg, and 38 ± 12 mg in the combined culture of *S. mutans* and each *E. durans*. The viable cells were 2.0×10^9 per ml in the culture of *S. mutans*, whereas being 2.0×10^7 to 6.0×10^7 per ml in the combined culture of *S. mutans* and *E. durans*.
5. The viable cells were 2.1×10^8 per ml in the culture of *S. oralis*, whereas being 1.4×10^7 to 7.0×10^7 per ml in the combined culture of *S. oralis* and *E. durans*.
6. Plasmid of about 60 kb was isolated in three isolates of *E. durans*.

These results suggested that *E. durans* isolated from the oral cavity inhibited the replication of *S. mutans* and formation of artificial plaque, while inhibiting the replication of *S. oralis* a little.

Key words : *Enterococcus durans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*