

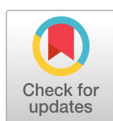
Journal of Korean Society of Dental Hygiene

Original Article

소아의 치아우식 부위별 우점 세균 분리 및 동정

김은미

광주보건대학교 치위생과



Isolation and identification of the abundant bacteria in dental caries in children

Received: September 14, 2018

Revised: September 19, 2018

Accepted: September 24, 2018

Eun-Mi Kim

Department of Dental Hygiene, Gwangju Health University

Corresponding Author: Eun-Mi Kim, Department of Dental Hygiene, Gwangju Health University, 73 Bungmun-daero(St) 419 beon-gil(Rd), Gwangsan-gu, Gwangju, 62287, Korea, Tel: +82-62-958-7639, Fax: +82-62-958-7631, E-mail: nambada7@ghu.ac.kr

Abstract

Objectives: The study aimed to isolate the abundant bacteria in dental caries in children and to investigate the bacterial species involved in addition to those that have been previously reported. **Methods:** The specimens were collected from the supragingival plaques of each dental caries area, pit and fissure caries, deep dentinal caries, smooth surface caries, and dental caries, and from healthy subjects in the control group. Bacteria were cultured from these specimens, DNA was extracted from the isolated bacteria, and the 16S rRNA gene sequences were analyzed and identified. **Results:** Based on the results of the 16S rRNA gene sequence analysis for the 90 strains of dominant bacteria from the 45 specimens, 5, 7, 8, 7, and 13 species were identified from the supragingival plaques from healthy teeth, pit and fissure caries, deep dentinal caries, smooth surface caries, and dental caries, respectively. In healthy teeth, *Actinomyces naeslundii* dominated. *Corynebacterium durum*, *Ralstonia pickettii*, and *Streptococcus intermedius* showed equal distribution. The dominant bacterial species in dental caries, *S. sanguinis*, showed the greatest difference in prevalence in pit and fissure caries. In deep dentinal caries, *S. mutans* and *Lactobacillus rhamnosus* were dominant; in smooth surface caries, *S. mutans* and *S. sanguinis* were dominant; and in the supragingival plaques of dental caries, *S. sanguinis* and *S. mutans* were dominant. **Conclusions:** The bacterial species isolated from dental caries encompassed four phyla, eight genera, and 22 species. In addition, the SS1-2 strain, belonging to the genus *Neisseria*, was identified as a new species from among the isolated strains.

Key Words: Dental caries, Identification, Isolation, 16S rRNA gene

색인: 동정, 분리, 치아우식, 16S rRNA 유전자

서론

2013년 세계보건기구의 보고에 의하면 전 세계 성인의 60%가 치아우식증과 치주질환을 겪고 있다. 특히 치아우식증은 남녀노소가 겪고 있는 국민질환이며, 세계에서 가장 흔한 만성 염증의 하나이다[1]. 또한 선진국은 물론 우리나라도 해마다 계속 발병률이 증가하고 있는 추세이다. 치아우식증은 숙주, 병원체 및 환경 요인 등이 복합적으로 작용하여 발생되며[2], 특히 세균의 역할은 필수적이다.

치아우식은 발생 부위에 따라 소와열구 우식, 심부 상아질 우식, 평활면 우식으로 구분된다. 소와열구의 구조는 많은 구강미생물이 정착하기 쉬운 형태를 갖고 있어, 우식의 발생빈도가 가장 높다. 심부 상아질 우식은 초기 치아우식이 상아질까지 진행된 상태이거나 2차 우식이 발생한 상태이다. 평활면 우식은 비교적 매끄러운 표면인 순(협)면, 설면, 인접면 등에 발생하는 우식이다. 치아는 부위에 따라 형태와 성분이 다르고, 또 환경적 조건이 다르므로 상재하는 미생물총이 다르며, 이에 따라 우식발생 양태에 차이가 생긴다[3].

Aas 등[4]의 연구에서 *Streptococcus mutans*는 백색 반점에서는 검출되지 않았고, 대부분 상아질 우식 또는 심부 상아질 우식에서 *S. mutans*를 검출했다고 보고했다. 더불어 *S. mutans*, streptococci, *Actinomyces* spp., *Atopobium* spp.는 치아우식 진행에 중요한 역할을 할 것으로 예상했다. Bowden[5]과 van Houte 등[6]의 연구에서도 역시 *S. mutans*가 치아우식증이 많이 진행된 우식부위 내 치태에서도 빈번하게 검출되는 것으로 미루어 초기 우식에 관여하는 것뿐만 아니라 우식의 진행에도 중요한 역할을 하는 세균으로 보고하였다. Gross 등[7]은 *S. mutans*는 치아우식 초기 단계에서 높은 수준으로 관찰되었지만 일부 건전한 치아에서도 관찰되었으며, 진행성 치아우식과는 통계적으로 유의한 관련이 없었다고 보고했다. 또한 *Lactobacillus*는 깊은 상아질 우식증에서 우세하였고, 우식증이 초기에서 깊은 병변으로 진행됨에 따라 급격히 증가했다고 보고했다. 이처럼 우식 부위별로 세균총이 다르게 나타나고 있어 실제 소아의 치아우식별로 우점하는 세균이 다를 것으로 생각된다.

치과분야에서 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 기반으로 한 분자생물학적 연구는 오래 전부터 진행되어 왔다. 이 분자생물학적 방법을 통해 동정되지 않은 많은 구강 내 세균과 함께 치은연하 세균 집단의 다양성을 확인했다. 현재 분자생물학적 방법으로 약 620종의 구강 내 세균 종을 확인하였고 그 중 35%는 아직 분리 배양되지 않은 상태이다. 심지어 한 연구에서는 구강 내 수천 종의 세균이 존재한다고 하였다[8]. 국내에서는 치아우식에 주로 관여한다고 알려져 있는 *S. mutans*와 *Streptococcus sobrinus* 등 특정 세균 분포에 관한 연구가 주를 이루고 있고 치아우식 부위별 우점 세균에 대한 연구는 미비한 상황이다. 비록 *S. mutans*가 치아우식을 일으키고 진행성 우식에 관여하는 주요 원인균으로 알려져 있으나 치면세균막에 존재하는 여러 세균들과 환경요인이 더해져 복합적으로 치아우식이 발생하므로 국내에 거주하면서 탄수화물을 주식으로 생활하는 소아의 치아우식 부위별로 우점하는 세균을 파악하는 것은 중요한 의미가 있다고 사료된다. 우식 부위별로 우점하는 세균을 분리해냄으로써 차후 치아우식 예방을 위한 다양한 예방 및 치료제를 개발하는 실험에 유용하게 활용되어질 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구의 목적은 소아의 치아우식 부위별로 채취한 치면세균막에서 세균을 분리하여 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열을 분석함으로써, 치아우식 부위별 우점 세균을 파악하고 기존의 보고된 종 이외에 치아우식에 관여하는 종을 탐색하고자 하였다.

연구 방법

1. 연구대상 및 시료 채취

본 연구는 광주 S치과에 내원한 12세 미만의 소아 중 보호자에게 실험의 취지를 설명하고 동의를 구한 45명의 소아에서 시료를 채취하였다. 건전한 치아 시료 5, 치아열구 우식 5, 심부상아질 우식 9, 평활면 우식 9, 우식치아의 치은연상 치면세균막 시료 17이었다. 시료를 채취한 소아의 평균 나이는 각각 7.0, 9.5, 7.0, 7.0, 7.0 이었다. 우식 치아는 각각 발생 양태를 구분한 소와열구 우식, 평활면 우식의 시료는 탐침기 및 범용 스켈러를 이용하여 채취하였고, 심부상아질 우식의 시료는 spoon excavator를 이용, 추가로 우식치아의 치은연상 치면세균막의 시료는 특수큐렛을 이용하여 채취, 모두 4부위에서 시료를 채취하였다. 그리고 대조군으로는 치아우식이 없고 수복된 치아가 없는 건전한 치아의 구치부 협면 및 설면의 치은연상 치면세균막을 특수큐렛을 이용하여 채취하였다. 시료 채취에 사용된 모든 기구는 멸균하여 사용하였다. 채취한 시료는 멸균된 0.85% 생리 식염수가 담긴 eppendorf tube에 채취한 기구를 흔들어서 넣고 즉시 실험실로 냉장 운반하여 균주를 배양하였다.

2. 우점 세균 분리

시료를 생리식염수에 10배 간격으로 단계별 희석하여 tryptic soy agar (TSA; Becton Dickinson) 및 brain heart infusion agar (BHI; Becton Dickinson) 배지에 도말하여 37°C에서 3일간 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 육안으로 다른 colony 형태를 보인 세균 균체를 확인하였고, 각 샘플마다 5% 이상의 점유율을 보인 세균을 BHI 배지에 다시 순수 배양될 때까지 계대배양 하였다. 순수 분리된 균체는 20% glycerol 용액에 넣은 후 -80°C에 냉동 보존하였다.

3. DNA 추출 및 PCR

순수 분리된 미생물 균체 1~2 loop를 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 2% SDS] 100 µl와 2 small spoon의 glass bead (size: 0.4 mm)를 혼합한 후 10분간 TOMY mixer (TOMY, USA)를 이용하여 균체를 파쇄 하였다. 1× TE buffer 200 µl와 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) 300 µl를 첨가하여 3 분간 TOMY mixer에 다시 혼합한 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min) 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮긴 후 RNase A (20 mg/ml) 3 µl를 첨가하여 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 0.1 volume의 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 2 volume의 차가운 100% ethanol을 첨가하여 DNA를 침전 시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 10min)하였다. 차가운 70% ethanol로 세척한 후 건조하여 증류수에 녹인 후 실험에 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

세균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 특이적으로 부착하는 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') 및 1492R (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer를 사용하여 증폭하였다[9]. PCR 반응 조성은 template DNA 10 ng, 200 uM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 0.15 mM MgCl₂, 3mM MgSO₄, 20ug BSA, 1U Taq. polymerase 그리고 forward와 reverse primer 각각 20 pmole을 첨가하고 멸균 증류수로 최종 50 µl로 맞춰 준비 하였다. PCR은 TP600 (TaKaRa, Japan)을 이용하였으며, PCR 조건은 predenaturation 과정으로 94°C에서 5 분간 수행하였고, denaturation (94°C, 30 초), annealing (55°C, 30 초), extension (72°C, 40 초) 반응을 총 30 회 반복하고 postextension (72°C, 10 분)을 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 증폭 크기를 확인하였다.

4. 염기서열 분석 및 세균 동정

16S rRNA 유전자 증폭산물은 Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, USA)으로 정제하였으며, 염기서열 분석 primer는 773F (5'-GGG AGC RAA CAG GAT TAG ATA-3') 및 803R (5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA G-3')을 사용하였으며, 반응 조건은 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분으로 총 25 cycle로 PCR 하였다. 염기서열 분석은 (주)마크로젠에 의뢰하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 유사도 분석은 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)[10] 및 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 염기서열을 비교하였다. 결정된 염기서열과 database에서 얻어진 염기서열은 MEGA6.06 프로그램을 이용하여 CLUSTAL_X로 정렬한 후 계통수 제작에 이용하였다[11,12]. 염기서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor distance model으로 이용하였으며, Neighbor-joining method로 계통수를 작성하였다[13,14].

연구결과

1. 세균 분리

건전한 치아, 소와열구 우식, 심부상아질 우식, 평활면 우식 및 우식치아 치은연상 치면세균막의 검체 수는 각각 5, 5, 9, 9, 17이며, 평균 나이는 7.5세 이었다. 건전한 치아 10 균주, 소와열구 우식 10 균주, 심부상아질 우식 18 균주, 평활면 우식 18 균주 및 우식치아 치은연상 치면세균막 34 균주, 총 90개의 균주를 분리하였다.

2. 16S rRNA세균 동정

총 90개의 우점 균주에 대해 염기서열 분석결과 평균 1,350 bp 이상의 부분적인 염기서열을 확인하였다. 유사도 지수를 기준으로 가장 높게 분석된 표준균주와 계통학적 분석 결과 *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* 및 *Bacteroidetes*로 크게 4개 문(Phylum)으로 분석되었다<Table 1>. 각 우식치아 별로는 소와열구 우식에서 *Actinobacteria* (42.2%) 및 *Firmicutes* (42.2%) 모두 높게 분리되었으며, 다음으로 *Proteobacteria* (15.6%)가 분리되었다. 심부상아질 우식에서는 *Firmicutes* (92.8%)와 *Actinobacteria* (7.2%) 두 개 문에서만 분리되었다. 평활면 우식에서는 *Firmicutes* (73.9%) 문이 높게 분리되었고, *Proteobacteria* (13.6%), *Actinobacteria* (11.3%) 문 순으로 분리 되었으며, 우식치아 부위 중 유일하게 *Bacteroidetes*문에 속하는 1 균주가 분리되었다. 마지막으로 치은연상 치면세균막에서는 *Firmicutes* (54.8%) 및 *Actinobacteria* (42.2%) 문이 높은 분리율을 보였고, *Proteobacteria* (2.9%) 문이 분리 되었다. 대조균인 건전한 치아의 치은연상 치면세균막에서는 그람양성 세균인 *Actinobacteria* (66.0%), *Proteobacteria* (19.1%), *Firmicutes* (14.9%) 순으로 분리되었다. 우식 치아 4 부위 모두에서 *Firmicutes* 문에 속하는 종들이 42.2-92.8% 범위로 매우 높게 분리되었다<Table 1>.

건전한 치아에서 세균의 종별 점유율을 살펴보면 *Acinomyces naeslundii* 종(51.1%)은 5개 검체 중 3개 검체에서 70%, 1개 검체는 20%, 전체 평균 66%로 매우 높게 분리되었다. *Corynebacterium durum*, *Ralstonia pickettii*, *Streptococcus intermedius* 종들이 약15%의 비율로 분리되었다. 우식부위에서 종별 점유율을 살펴보면 소와열구 우식에서는 *Streptococcus sanguinis* 종이 5개 검체 중 4개 검체에서 20% 이상 우점하였다. 그리고 *Rothia dentocariosa*, *Neisseria macacae*, *Actinomyces naeslundii*, *A. oris*,

Streptococcus oralis, *S. mutans* 종 순으로 전체 7종이 분리되었다. 심부상아질 우식 및 평활면 우식에서는 *S. mutans* 종이 각각 46.4%와 58.4%로 가장 높게 분리되었다. 심부상아질 우식에서 *S. mutans* 다음으로 분리된 우점종은 *Lactobacillus rhamnosus*, *S. salivarius*, *S. oralis* 등 이었고 10% 이상씩 점유하였다. 평활면 우식에서는 *S. sanguinis* 15.4%, *Neisseria perflava* 종이 9% 이상 분리되어 우식부위에 따라 차이가 있었으며, 유일하게 *Bacteroidetes* 문에 속하는 *Capnocytophaga sputigena* 종이 분리되었다. 또한 평활면에서는 1개 검체에서 *Neisseria* 속에 속하는 하나의 균주를 분리하였는데, 기존에 분리된 *Neisseria* 표준균주와 16S rRNA 유전자 염기서열이 97% 이하의 유사도를 보였다. 통상 세균의 동정 시 16S rRNA 유전자 염기서열이 표준균주와 97% 이하를 보이면 새로운 종으로 동정하며, 진화적 유연관계를 나타내는 계통도에서도 기존 종과 근연관계가 분리된 것을 확인하였다(Fig. 1). 우식치아의 치은연상 치면세균막은 17개 검체를 대상으로 하였으며 가장 높게 분리된 종은 *S. sanguinis*로 26.3%였고, 10% 이상 분리된 종들은 *S. mutans*, *A. oris*, *A. viscosus* 종, 그 다음으로 분리된 종은 *A. naeulundii*, *Rothia aeria*, *Streptococcus mitis* 순으로 우점 하였으며, 총 13종이 분리 및 동정되었다.

구강 상재균 및 치아우식에 관여하는 대표적인 *A. naeulundii*, *S. sanguinis*, *S. mutans*, *S. oralis* 종들의 치아 우식부위로부터 분리양상을 살펴보면 *A. naeulundii*는 건전한 치아에서 높게 분리되었고, *S.*

Table 1. Relative abundance (>5%) of the species identified in healthy subject and four different dental caries

Species	HS* (n=5)	Dental caries**				Phylum
		PF (n=5)	DD (n=9)	SS (n=9)	SP (n=17)	
<i>Actinomyces naeulundii</i>	51.1	13.3			9.1	<i>Actinobacteria</i>
<i>Actinomyces oris</i>		13.3	1.1		12.0	
<i>Actinomyces viscosus</i>			0.9	7.8	12.0	
<i>Corynebacterium durum</i>	14.8			3.5		<i>Bacteroidetes</i>
<i>Rothia aeria</i>					9.1	
<i>Rothia dentocariosa</i>		15.6	5.2			
<i>Capnocytophaga sputigena</i>				1.3		<i>Proteobacteria</i>
<i>Neisseria bacilliformis</i>					0.4	
<i>Neisseria elongata</i> subsp. <i>glycolytica</i>					2.5	
<i>Neisseria macacae</i>		15.6				
<i>Neisseria</i> sp.				3.9		
<i>Neisseria subflava</i>	4.3			9.7		<i>Firmicutes</i>
<i>Neisseria perflava</i>						
<i>Ralstonia pickettii</i>	14.9					
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>			5.4			
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>			17.4		2.3	
<i>Streptococcus intermedius</i>	14.9				2.7	
<i>Streptococcus mitis</i>					6.3	
<i>Streptococcus mutans</i>		6.7	46.4	58.4	15.2	
<i>Streptococcus oralis</i>		7.8	10.6		0.7	
<i>Streptococcus salivarius</i>			13.0		1.4	
<i>Streptococcus sanguinis</i>		27.7		15.4	26.3	
Sum	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	

*HS, healthy subject. **PF, pit and fissure caries; DD, deep dentinal caries; SS, smooth surface caries; SP, supragingival plaque

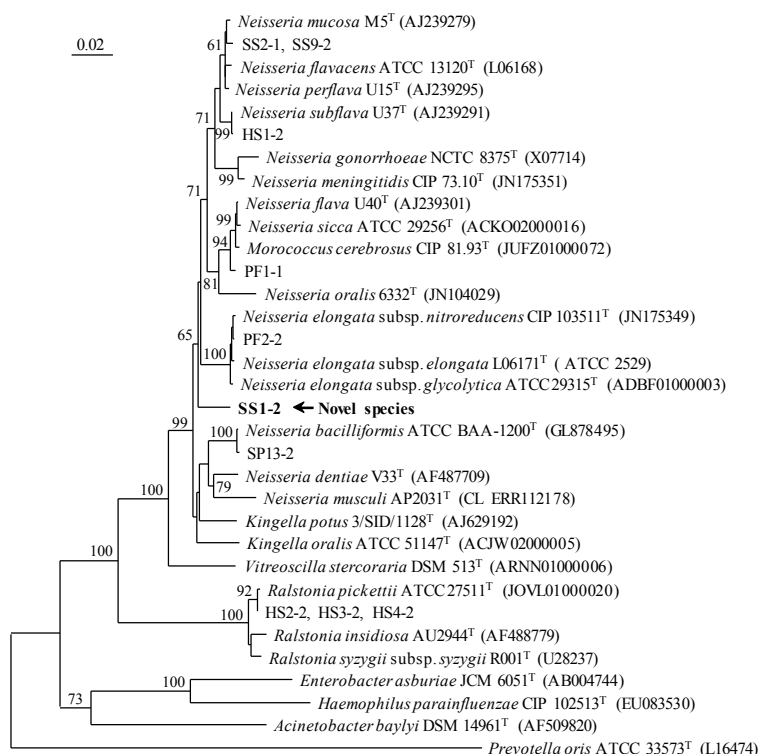


Fig. 1. Neighbour-joining tree based on partial 16S rRNA gene sequences showing relationships between dental caries and related genera of the phylum *Proteobacteria*. The percentage numbers at the nodes indicate the bootstrap support levels, based on neighbor-joining analysis of 1,000 resampled data sets. Bar, 0.02 nucleotide changes per 16S rRNA gene position. HS, healthy subject; PF, pit and fissure caries; SS, smooth surface caries; SP, supragingival plaque

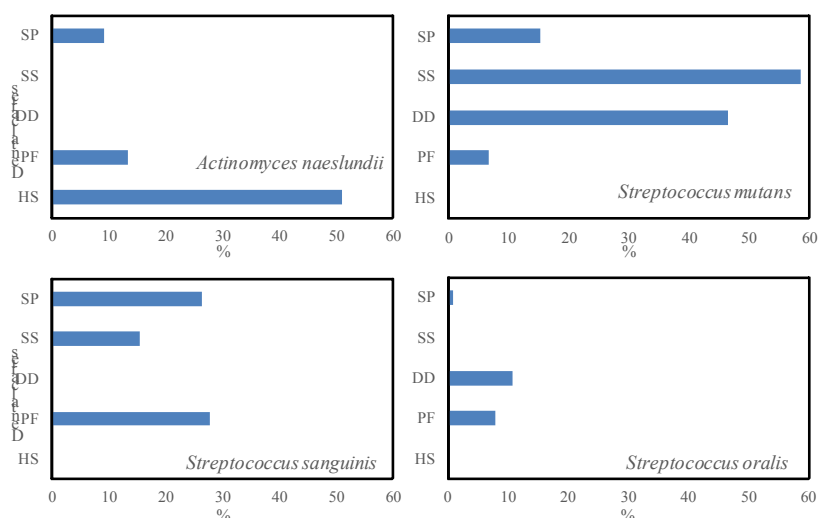


Fig. 2. Composition of caries-associated species in healthy subject and four different dental caries. HS, healthy subject; PF, pit and fissure caries; DD, deep dentinal caries; SS, smooth surface caries; SP, supragingival plaque

*mutans*는 심부상아질 우식 및 평활면 우식에서 높게 분리되었다. 그리고 *S. sanguinis*는 소와열구 우식과 치은연상 치면세균막에서 높게 분리되었다<Fig. 2>. 본 연구에서 분리된 종 구성은 4 개문, 8 속, 22 종으로 동정되었다<Table 1>.

총괄 및 고안

현재 구강 혹은 치아우식 부위의 미생물 군집 구조 및 다양성을 확인하는 방법은 배양하지 않고 샘플 내 DNA를 직접 분리하여 16S rRNA 유전자를 증폭하고 차세대염기서열분석(Next generation sequencing; NGS)을 하는 방법이 주를 이루고 있다[15-17]. 이러한 16S rRNA 유전자를 이용한 NGS 방법으로 구강 내 존재하는 세균 종(species) 수는 1,000여 종까지 분석되었다[18]. NGS 기법은 배양하지 않고 검체 내 세균 DNA를 추출하여 군집 및 다양성을 해석하는데 매우 유용한 도구이지만 구강 내 사멸된 세균에서도 DNA가 다량 추출되어 PCR 반응에서 많은 오류를 범하게 된다. 따라서 실제 검체 내 살아있는 세균을 대상으로 군집 및 다양성을 파악하고 분리된 세균의 생리적 특징 및 항생제 저항성, 전체 유전체 분석 등의 특성을 파악하기 위해서는 반드시 세균의 배양이 필요하다. 따라서 본 연구는 치아우식 네 부위 40 검체 및 건전한 치아에서 5 검체를 대상으로 두 가지 배지를 이용하여 분리하였다. 그리고 분리된 세균은 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하고 동정하여 우식 부위별로 어떠한 세균이 분리되고 우점 하는지 파악하고자 하였다.

구강 내 치면 세균막에는 약 10^8 - 10^9 CFUs/mg 정도의 세균이 존재하는 것으로 보고되고 있다[19]. 본 연구에서 배양 배지별 세균 분리 수는 건전한 치아의 치면세균막(HS)의 TSA 및 BHA 배지의 분리 수는 각각 5.6×10^7 CFUs/mg과 4.5×10^7 CFUs/mg 으로 배지별로 비슷하게 분리되었으며, 또한 치아우식 부위 각각에서도 배지별 큰 차이는 보이지 않았다.

최근 보고된 Santigli 등[15]의 NGS 분석을 통한 결과를 보면 건전한 소아 치면세균막에서 보고된 문(phylum)은 *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* 순으로 우점하였고, SR1, Spirochaetes, TM7, *Tenericutes* 문 순으로 낮게 분포하였다. 소아의 치아 우식 부위별로 분석한 Kim 등[20]의 보고에서는 *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* 문 순으로 우점하고, TM7 문은 매우 낮게 분포한다고 하였다. 본 연구의 건전한 치아의 치면세균막 5검체에서 *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* 문 순으로 분석되어 Santigli 등[20]의 결과와 차이가 있었다. 우식 치아에서는 네 부위 모두 다 *Firmicutes* 문이 42.2-92.8%로 가장 높게 우점하였으며, 그 다음으로 *Actinobacteria* (7.2-42.2%), *Proteobacteria* (0-19.2%), *Bacteroidetes* (0-1.3%) 문 순으로 우점 하였다.

각 우식 부위와 건전한 치아의 치면세균막에서의 우점 세균 종은 비교적 차이를 보였다. 특히 *Actinomyces naeslundii* 종은 건전한 치아에서 51.1% 우점 하지만 소와열구 우식에서는 13.3%, 우식치아의 치은연상 치면세균막에서는 9.1%, 심부상아질 우식 및 평활면 우식에서는 분리되지 않았다. 이는 *A. naeslundii* 종은 구강 및 치면 세균막에 정상 균총으로 존재하는 기회 감염균이고 치근우식에서 많이 분리되며, 또한 균주 간 매우 많은 유전형이 보고[21] 되고 있기 때문으로 보인다. 각 우식 부위 중 심부상아질 우식 및 평활면 우식에서 우점하는 종은 *Streptococcus mutans*이며, 소와열구우식, 치은연상 치면세균막에서는 *S. sanguinis*가 우점 하였다. 안 등[22]의 우리나라 어린이 심부상아질 우식 부위에서 *S. mutans*가 치아우식증과 밀접한 연관성이 있는 것으로 보고된 결과와 일치하였다. 다만 동 논문에서 *S.*

*mutans*와 *Streptococcus sobrius*의 동반출현이 치아우식증과 더욱 밀접한 관련이 있는 것으로 보고한 데 반해 이번 실험에서 *S. sobrius* 군이 분리되지 않은 것은 차이가 있어 보인다. 이는 치아우식에 관여하는 요인 3대 요인 중 하나인 어린이가 섭취하는 음식물의 당에 있어 차이가 있을 것으로 보인다. 또한 국 등[23]의 소아의 치은연상 치면세균막에서의 세균 분포 결과는 *S. mutans* 종 발현빈도가 *S. sobrinus* 발현 빈도보다 약 2.2배 정도 높은 것으로 보고 하였다. 이번 연구에서 *S. sanguinis*가 우점하는 것과는 다른 결과를 보였다. 물론 국 등의 연구는 소아 치아우식 주 원인균으로 알려져 있는 *S. mutans*와 *S. sobrius* 두 종이 주로 존재한다는 전제 하에 이루어진 실험으로 상이한 결과를 보인 것이다. 특히 치은연상 치면세균막에서 우점한 *S. sanguinis*는 최근 발표된 논문에서 역학 및 생체 외 연구 등에서 치아우식증의 발생을 억제 할 수 있음을 시사하는 내용을 보고 하였다. 그렇지만 *S. sanguinis*의 우식 억제 역할을 뒷받침 할 직접적인 증거는 부족한 실정이라고 하였다[24]. 그런 점에서 *S. sanguinis*가 우점한 결과는 계속적으로 연구가 이루어져야 할 부분이라고 생각된다. 일반적으로 치아우식 원인 세균으로 *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Rothia dentocariosa*, *S. milleri*, *S. mutans*, *S. salivarius* 및 *S. sanguinis* 종이 대표적으로 알려져 있다[25]. 본 연구에서는 *L. acidophilus*, *L. casei*, *S. milleri* 3종을 제외하고는 모두 분리 되었다. 이외 *A. oris*, *Corynebacterium durum*, *R. aeria*, *Capnocytophaga sputigena*, *Neisseria bacilliformis*, *N. elongata* subsp. *glycolytica*, *N. macacae*, *N. perflava*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *L. rhamnosus*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. oralis* 종도 분리 되어 다양한 종을 확인할 수 있었다.

각 우식 부위로부터 90 개의 우점 균주를 분리하여 염기서열을 분석한 결과 종 구성은 4 개문, 8 속, 22 종으로 다양하게 분석 되었다. 치아 우식을 일으키는 세균은 기회성 감염균으로 작용하는 경우가 많으며, 개인의 위생관리, 가족력, 면역 등 다양한 요소에 따라 치아우식 발생이 복합적으로 작용하며[26], 기존의 알려진 종뿐만 아니라 배양이 이루어지지 않은 세균과도 매우 밀접한 연관성이 있을 것으로 사료된다. 이러한 균주들의 생리적, 화학적 특성을 파악하는 데는 일단 배양이 이루어져야 한다. 따라서 기존의 DNA 분석법으로 동정되었지만 배양이 안 되는 세균 종들의 분리를 위해서는 다양한 배양법 개발도 이루어져야 할 것으로 본다. 구강 내 미생물 군집 구조 분석 결과 배양하지 않고 DNA 분석법을 이용하여 무수히 많은 세균 종이 보고되고 있고 이것들 중 배양은 안 되고 있지만 16S rRNA 유전자 동정을 통하여 배양 배지에서 분리가 된다면 더욱 많은 신규 미생물이 등록되어 질 것이다[20]. 그런 관점에서 특히 본 연구에서 주목할 만한 사항은 평활면 우식 부위 1개의 검체에서 *Neisseia* 속에 속하는 하나의 균주를 분리한 것이다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 확인한 결과 표준균주와 97% 이하의 유사도를 보여 *Neisseia* 속에 속하는 것으로 확인되었다. 더불어 진화적 유연관계를 나타내는 계통도에서도 기존 종과 근연관계가 분리된 것을 확인하였다. 이는 신규 미생물로서의 의미가 있다고 보여지며, 신규 미생물 등록을 위한 차후 실험을 진행 할 계획이다. 차후 이 균의 기본적인 특성, 병원성 유무 등을 확인하는 실험을 진행하고 추가적으로 유전자 특징을 파악하기 위한 전체 유전체 분석 등의 추후 연구가 이루어져야 할 것이다.

결론

본 연구는 소아의 치아우식 부위별 우점 세균을 분리하고 기존의 보고된 종 이외에 치아우식에 관여하는 종을 탐색하고자 하였다. 각각의 치아우식 부위 즉 소와열구 우식, 심부 상아질 우식, 평활면 우식, 우식 치아의 치은연상 치면세균막과 대조군으로 건전한 치아의 치은연상 치면세균막에서 채취한 검체로부터

세균을 배양하고, 분리된 세균의 DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석 및 동정하였다. 전체 45 검체로부터 우점 세균 90 개 균주에 대해 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 건전한 치아, 소와열구 우식, 심부상아질 우식, 평활면 우식 및 우식 치아의 치은연상 치면세균막에서 각각 세균 5, 7, 8, 7 및 13 종을 확인하였다.

2. 건전한 치아에서는 *Actinomyces naeslundii* 종이 우점 하였고 다음으로 *Corynebacterium durum*, *Ralstonia pickettii*, *Streptococcus intermedius* 종이 유사하게 분포하였다.

3. 치아의 우식부위별 우점종으로 소와열구 우식에서는 *S. sanguinis* 종이 가장 높은 분리율을 보였고, 심부상아질 우식에서는 *S. mutans* 및 *Lactobacillus rhamnosus*, 평활면 우식에서는 *S. mutans* 및 *S. sanguinis* 그리고 우식치아 치은연상 치면세균막에서는 *S. sanguinis* 및 *S. mutans*가 우점 하였다.

결론적으로 치아우식 부위로부터 분리된 종 구성은 4 개문, 8 속, 22 종으로 다양하게 분석 되었다. 또한 분리된 균주에서 *Neisseria* 속에 속하는 SS1-2 균주가 새로운 종으로 확인되었다.

Acknowledgements

본 연구는 2018년도 광주보건대학교 학술연구비 지원(3018010)에 의해 수행되었음.

References

- [1] Lee KH, Koo HH, Kim HL, Park JY, Jeon HJ, Jung ES. Factors affecting fluoride perception in the general population. J Dent Hyg Sci 2018;18(3):323-34. <https://doi.org/10.13065/jksdh.2018.18.03.323>
- [2] Chon IY, Yu EJ, Yu SC, Lee JY, Jung SH, Oh TJ. The antibacterial effect of *Pleurotus eryngii* extracts on oral bacteria. J Dent Hyg Sci 2018;18(1):9-18. <https://doi.org/10.13065/jksdh.2018.18.01.9>
- [3] Nikiforuk G. Understanding dental caries: etiology and mechanisms basic and clinical aspects. Vol 1. Basel: Karger; 1985: 1-23.
- [4] Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol 2008; 46(4):1407-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01410-07>
- [5] Bowden GH. Microbiology of root surface caries in humans. J Dent Res 1990;69(5):1205-10. <https://doi.org/10.1177/00220345900690051701>
- [6] Van Houte J, Jordan HV, Laraway R, Kent R, Soparkar PM, DePaola PF. Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. J Dent Res 1990;69(8):1463-68. <https://doi.org/10.1177/00220345900690080301>
- [7] Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA, et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. J Clin Microbiol. 2010;48(11):4121-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01232-10>
- [8] Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. Caries Res 2013;47(2):89-102. <https://doi.org/10.1159/000345367>
- [9] Lane DJ. 16S/23S sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Edited by Stackebrandt E, Goodfellow M. Chichester: Wiley; 1991: 115-75.

- [10] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, et al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;67(5):1613-7. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- [11] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30(12):2725-9. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- [12] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25(24):4876-82. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- [13] Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: *Mammalian Protein Metabolism*. Vol. 3. Edited by Munro H. N. New York: Academic Press. 1969: 21-132.
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4(4):406-25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- [15] Santigli E, Koller M, Klug B. Oral biofilm sampling for microbiome analysis in healthy children. *J Vis Exp* 2017;130(e56320):1-13. <https://doi.org/10.3791/56320>
- [16] Freitas AO, Markezan M, Nojima Mda C, Alviano DS, Maia LC. The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: A systematic review. *Dent Press J Orthod* 2014;19(2):46-55. <https://doi.org/10.1590/2176-9451.19.2.046-055.oar>
- [17] Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J*. 2011;6(1):46-56. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.85>
- [18] Siqueira JF Jr, Rôças IN. The oral microbiota in health and disease: An overview of molecular findings. *Methods Mol Biol*. 2017;1537:127-38. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6685-1_7
- [19] Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2000;2(13):1599-607. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01316-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01316-2)
- [20] Kim EM, Baik KS, Ha MO. Bacterial diversity in children's dental caries. *J Korean Soc Dent Hyg*. 2013;13(5):889-900. <https://doi.org/10.13065/jksdh.2013.13.05.889>
- [21] Guo B, Yang F, Jia Y, Xia Q, Zhou XD. The genotypic diversity of oral *Actinomyces naeslundii* of root caries in aged people. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2010;28(6):646-8. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-1182.2010.06.019>
- [22] Ahn ST, Park JH, Lee NY. Prevalence of *Streptococcus mutans* and *streptococcus sobrinus* in children under 6 years of age. *J Korean Acad Pediatr Dent* 2005;32(2):207-16.
- [23] Kook JK, Park JW, Yoo SY, Kim HS, Lee NY. Distribution of mutans streptococci in dental plaque of children. *J Korean Acad Pediatr Dent* 2004;31(3):439-47.
- [24] Bin Z, Lorna CM, Todd K, Ping Xu. *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future microbiology* 2018;13(8):915-32. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0043>
- [25] Kim YK, Han MD, Oral microbiology. 3rd ed. Seoul: Komoonsa; 2001: 261-84.
- [26] Yoo SM, Jeong SK, Yoo HJ, Jang JH, Analysis of total oral microorganisms in saliva using real-time PCR and colony forming unit. *J Korean Soc Dent Hyg* 2017;17(1):13-25. <https://doi.org/10.13065/jksdh.2017.17.01.13>