

## 齙齒에서 分離한 Streptococci에 관하여

李 建 柱 · \*李 培 成

(대한중외제약(주) · \*진국대학교 미학원 생물학과)

### Characterization of Streptococci Isolated from Human Dental Plaque.

LEE, Kon Joo and Bae Ham LEE

(Dae Han Choong-Wae Pharm. and \*Dept. of Biology, Kun-Kuk Univ.)

#### ABSTRACT

Forty-six *Streptococci* were isolated from human dental plaque.

Each isolate from a different person, and their morphological and physiological characteristics investigated.

It was found that the isolated micro-organisms

1. Most of them were non-haemolytic.
2. Acid produced from maltose, inulin, manitol, sorbitol, lactose, mannose. Arabinose and xylose fermentations are variable.
3. In the sucrose broth, most of them formed gelatinous clusters adhering to the wall of the tube.

#### 緒 論

齙齒가 微生物의 作用에 의해서 일어난다는 개념은 Miller(1883)에 의해서 제기 되었으나 일반론으로 받아들여지기는 Teuscher(1948)등의 연구 이후이다. Oral cavity는 음식의 섭취에 의한 음식 잔류물과 적당한 온도 조건 및 습윤 상태로 微生物이 서식하기에 적합한 조건이 되며, 일반적으로 구강 내에는 10억 이상의 微生物이 서식한다. Howe & Hatch(1917) 및 McIntosh(1922)등은 *Bacillus acidophilus*가 齙齒부위에서 항상 나타난다고 보고 했다. 그 후 Clarke(1924)에 의해서 *Streptococcus mutans*가 보고 되고, Bunting(1925)에 의해

*Lactobacillus acidophilus*가 보고 되었다. 그 후 Francis(1969)는 충치에서 *lactobacilli*를 분리했다. Fitzgerald등 (1960)은 hamster에서 *Streptococci*와 연관있는 Strains을 분리하고 이를 다시 hamster에 접종시켜 충치를 유발시키는데 성공했다. 그 후 Fitzgerald등 (1965)의 연구에 의해 *Streptococcus mutans*가 충치의 원인균으로 밝혀졌다. 충치로부터 *Streptococcus mutans*를 분리하는 데는 *Streptococcus (Strept) sanguis*, *Strept. milis*, *Strept. salivarius* 등에 의해 혼란을 가져오기 쉬웠다. *Strept. mutans*의 selective medium이 연구되어 오던 중 Gold(1973)에 의해 강력한 selective medium이 고안되어 연구가 용이하게 되었다. 충치에 관해 많은 연구가 이루어지고

있지만 아직까지 많은 문제점을 가지고 있는 질병으로 현재 예방을 위한 많은 연구가 이루어지고 있다. 본인은 Gold의 modify selective medium으로 수집한 총치 Sample에서 *Streptococcus sp.*를 분리하고 그 생리의 특징을 조사한 결과를 보고한다.

## 材料 및 方法

### 1. 齧齒 Sample

1977년 7월 부터 1978년 8월 사이에 대학 병원 및 개인 치과 병원에서 발치한 300여 개의 齧齒를 수집하고 그 중 50개를 실험 재료로 하였다.

### 2. 分離用 培地(BSB)

Brain Heart Infusion Agar (Difco) + 150g sucrose/l + 0.2unit Bacitracin/ml

### 3. 分離方法

총치 sample을 수집한 후 70% alcohol에 1 hour 처리한 후 멸균 생리식염수에 넣어 냉장고에 보존하였다. 분리 당일을 Sample을 마쇄하여 dilution method에 의해 분리하였다. 배양 조건은  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}$  24~48 hours로 candle jar를 이용하였다.

### 4. 형태적 특징

Blood agar와 BHI (Difco) agar에서 candle jar 및 호기 상태로  $37^{\circ}\text{C}$  24 hours간 배양하여 저배율로 관찰하였다. 그리고 Todd Hewitt (Difco) borth에서 18 hours 배양한 것은 Gram's stain하여 검경하였다.

### 5. 생리적 특징

Catalase Production  $45^{\circ}\text{C}$  성장, litmus milk 반응, methylene blue milk 반응, NaCl tolerance, sucrose broth에서 gel formation의 실험은 Carlsson(1965)에 따랐으며, pH 9.6에서 생장은 Edward-sson(1968)에 따랐다. 당발효는 phenol Red Broth Base (Difco)에 0.5% Tween 80 (v/v)를 첨가하여 각각의 당을 무균 여과하여 최종 농도가 1%되게 했으며 Starch는 0.2% (w/v)되게 하였다. Starch broth에 반응은 14일 후 Lugol's iodine과 1.6%

의 Bromo-thymol blue의 alcoholic solution을 가해 조사하였다. Aesculin 분해는 Trypti case 1%, Yeast extract 0.5%, Ferric citrate 0.05%, NaCl 0.5%, aesculin, 0.1%, pH 6.5로 조절하여 실험하였다.

## 結果 및 考察

Brain Heart Infusion Agar와 Blood Agar에서 colony는 white circular 또는 irregular colony였으며 surface는 smooth였다. 전 균주가 Gram positive cocci였고 catalase는 9 균주가 positive를 나타냈다. Broth에서 배양시 short 또는 medium chain이 형성되었다. Blood Agar에서는 생장한 전 균주가 haemolysis를 일으키지 않았다. 생리적 특징은 Table 1에서 보는 바와 같이 sucrose broth에서 48 hours후의 pH는 4.3 이하였으며 aesculin의 가수 분해는 26 균주가 positive를 나타냈고 생장조건에서는  $45^{\circ}\text{C}$ 에서 44 균주가 자랐고 pH9.6에서 생장은 19 균주가 positive를 나타냈다. Blood agar에서는 candle jar에서 41균주가 자랐고 aerobic하에서 39균주가 자랐고 NaCl 저항성은 4%에서 43 균주가 6.5%에서는 4균주가 positive였다. Methylene blue 환원능은 0.01%에서 35 균주가 0.1%에서 8 균주가 환원 능력을 나타냈다. Starch broth의 경우 Lugol's iodine 첨가시 7 균주가 yellow로 변색 했으며, brom thymol blue 첨가시 7 균주가 yellow로 변했다. Sucrose broth에서 Ethanol 첨가(1 part)때 42 균주가 침전이 많이 생겼다. Table 2에서 보는 바와 같이 당류에 대한 fermentation 능력은 maltose는 전 균주가, mannitol, sorbitol lactose는 44균주가, arabinose는 29 균주가 xylose는 15 균주가 fermentation 능력이 있었다.

분리된 균주 전부가 Gram positive고 short 또는 medium chain을 형성하고 catalase반응으로 보아 *Streptococcus sp.*로 확인되었다.

**Table 1.** Characters of Caries Streptococci Isolated from Human Dental Plaque

Characteristics	No. of Positive Strains	% of Total
Final pH after 48hr.		
in Sucrose Broth	4.3	46
	4.3	0
Hydrolysis of Aesculin	26	57
Growth at		
45°C	44	96
pH 9.6	19	41
5% Blood Agar (Aerobic)	39	85
5% Blood Agar (Anaerobic)	41	89
in 4% NaCl	43	94
6.5% NaCl	4	9
Reduction of Methylene blue 0.01%	35	76
0.1%	8	17
Catalase	9	20
Reaction in Starch Broth		
;Lugol's Iodine added Blue black	39	85
Yellow	7	15
;Brom thymol blue added Green	39	85
Yellow	7	15
Heavy Prec. in Sucrose Broth after add. of 1part of EtOH	42	91

**Table 2.** Fermentation Reaction of Caries Streptococci Isolated from Human Dental Plaque

No. of Starns Acid from	14	12	11	2	2	2	1	1	1	% Positive culture
D(+) Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
Inulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
D(-) Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	96
D(-) Sorbitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	96
Lactose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	96
D(-) Mannose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	94
D(-) Arabinose	+	-	+	-	-	+	-	+	+	93
D(+) Xylose	+	-	-	-	-	-	-	+	-	33

충치 원인론은 많은 학자들에 의해 연구 분석되어 왔으나 아직 문제점이 많은 분야이다. 1924년 Clarke는 충치에서 분리한 균을 *Strept. mutans*라 명명했고, 그 후 균의 분리에의 문제점이나 변이등에 의해 자료상 차이점이 많았다. 생리적 특성에 관한 조사는 Keyes(1968), Edwardsson(1968)등에 의해서 비교적 자세히 조사되었다. 본 실험에

서 조사한 균주는 당분해능은 maltose, inulin, mannitol, sorbitol, lactose, mannose가 거의 분해되는 것으로 나타났고 arabinose와 xylose는 균주에 따라 차이를 보였다. Table 4에서 보는 바와 같이 당류의 fermentation은 각 species에 따라 차이점을 나타냈는데, inulin, mannitol, sorbitol, lactose, arabinose, xylose에서 특히 다른

Table 3. Characters of Streptococci

Streptococcal species	pH range in glucose broth	Methylene blue (0.1% in milk)	Sodium chloride (6.5%)	Groth initiation at pH 9.6	Hydrolysis of:	
					Starch	Esculin
Test organisms	≤4.3	-	-	d	-	d
<i>S. pyogenes</i>	4.8-6.0	-	-	-	-	+
<i>S. equisimilis</i>	4.6-5.4	-	-	-	d	d
<i>S. zooepidemicus</i>	4.6-5.0	-	-	-	+	+
<i>S. equi</i>	4.8-5.5	-	-	-	ND	-
<i>S. dysgalactiae</i>	4.4-5.2	-	-	-	ND	d
<i>S. sanguis</i>	4.6-5.2	-	-	-	-	+
<i>S. pneumoniae</i>	5.0	ND	-	ND	ND	ND
<i>S. anginosus</i>	4.5-5.2	-	-	-	-	+
<i>S. agalactiae</i>	4.2-4.8	-	-	-	-	-
<i>S. acidominimus</i>	>6.0	-	-	-	-	-
<i>S. salivarius</i>	4.0-4.4	-	-	-	-	+
<i>S. mitis</i>	4.2-5.8	-	-	-	-	-
<i>S. bovis</i>	4.0-4.5	-	-	-	+	+
<i>S. equinus</i>	4.0-4.5	-	-	-	+	+
<i>S. thermophilus</i>	4.0-4.5	-	-	-	+	-
<i>S. faecalis</i>	4.1-4.6	+	+	-	-	+
<i>S. faecium</i>	4.0-4.4	+	+	+	-	+
<i>S. avium</i>	4.2	-	+	+	-	+
<i>S. uberis</i>	4.6-4.9	-	-	+	d	+
<i>S. lactis</i>	4.0-4.5	+	-	-	-	d
<i>S. cremoris</i>	4.0-4.5	d	-	-	-	d

\* - = most (90-100%) strains negative; + = most (90-100%) strains positive;

ND=no data or insufficient data; d=some strains positive, some negative.

species와 본조사 균주와 차이를 보였다. Table 3에서 보는 바와 같이 glucose broth에서 최종 pH는 공시 균주가 전부 pH 4.3 이하였고 0.1% Methylene blue milk의 환원 능력은 공시 균주 중 17%만 positive였으며 *Strepto. faecalis*, *Strepto. faecium*, *Strepto. lactis*를 제외한 전 species가 negative 반응으로 나타나었다. 6.5% NaCl tolerance에서는 공시 균주 중 9%가 positive였는데 *Strepto. faecalis*, *Strepto. faecium*, *Strepto. avium*을 제외한 전 species가 negative였다. pH 9.6에서 생육은 공시 균주 41%가 positive로 균주에 따라 차이를 나타냈고 Starch의 가수분해는 15%가 positive를 나타냈고 esculin의 가수분

해는 57%가 positive를 나타내서 균주에 따라 차이를 보였다(Table 4). Table 3과 Table 4에서 Bergey's manual의 Strept. sp들의 특징과 공시 균주의 특징의 비교에서 보는 바와 같이 공시 균주는 많은 차이점을 나타냈다. 실험 결과 중에서 sorbitol을 분해해서 산을 생성하는 균주가 96%였는데 이는 Fitzgerald등 (1960)가 sorbitol의 분해능이 충치 유발 균주의 몇가지 특징 중의 하나라고 지적한 것과 일치하며 sucrose broth에서의 배양액에 1 part의 ethanol을 첨가할 때 침전이 생기는 것이 역시 충치 유발 균주의 특징의 하나로 보고되어 있다. (Gugenheim등 (1966)) 또한 Blood agar에서 성장한 전 균주가 haemolysis를 일으키

**Table 4.** Fermentation Reactions of Streptococci

Streptococcal species	Maltose	Inulin	Mannitol	Sorbitol	Lactose	Mann-ose	Arabi-nose	Xylose
Test organisms	+	+	+	+	+	+	±	±
<i>S. pyogenes</i>	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. equisimilis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. zooepidemicus</i>	±	-	-	+	±	-	-	-
<i>S. equi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. dysgalactiae</i>	+	-	-	±	±	-	-	-
<i>S. sanguis</i>	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i>	+	+	±	-	+	+	+	+
<i>S. anginosus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. agalactiae</i>	+	-	-	-	±	-	-	-
<i>S. acidominimus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. salivarius</i>	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>S. mitis</i>	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. bovis</i>	+	±	±	±	+	+	±	±
<i>S. equinus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. faecalis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>S. faecium</i>	+	-	±	±	+	±	±	±
<i>S. avium</i>	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>S. uberis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. lactis</i>	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>S. cremoris</i>	-	-	-	-	+	-	-	-

\* - = most strains negative + = most strains positive ± = some strains positive, some negative.

지 않는 Non-haemolytic strain이었다. 이러한 유발 균주인 *Streptococcus mutans*로 생각한 것들로 보아 공시 균주는 대부분 충치 원인이 된다.

적 요

충치 sample 50개에서 46 strains의 Streptococcus sp.를 분리하여 그 생리적 특성을 조사한 바

1. 대부분의 균주들이 non-haemolytic strain이었으며,
2. 기질로 maltose, inulin, mannitol, sorbitol, lactose, mannose를 분해하여 산을 생성하고 arabinose와 xylose는 균주에 따라 차이를 보였으며,
3. Sucrose broth에서는 거의 gel을 형성하였다.

REFERENCES

1. Eunting, R. W. and F., Palmerlee, 1925. The role of *Bacillus acidophilus* in dental caries. *D. Cosmos* **68**, 931~937.
2. Carlsson, J., 1965. Zooglea-forming streptococci, resembling *Streptococcus sanguis* isolated from dental plaque in man. *Odont. Revy* **16**, 348-358.
3. Clarke, J.K., 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br. J.*

- Exp. Path.* **5**, 141~147.
4. Edwardsson S., 1968. Characteristics of inducing Human Streptococci Resembling *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol* **13**, 639~646.
  5. Francis, E. S. and E. G. Robert, 1969. Biochemical and Antigenic Studies of Lactobacilli Isolated from Deep Dental Caries. 1. Biochemical Aspects. *J. Dent. Res.* May-June 356~369
  6. Fitzgerald D. B. and R. J. Fitzgerald, 1965. Induction of dental caries in gerbilis. *Arch. Oral Biol.* **11**, 139~149.
  7. Fitzgerald R. J. and P. H. Keyes, 1960. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J. Am. dent. Ass.* **61**, 9~19
  8. Gold, O. G., H. V. Jordan and J. Van Houtte, 1973. A Selective Medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **18**, 1357~1365
  9. Guggenheim, B., K. G. König, E. Hepzog, and H. R. Mühlemann, 1966. The cariogenicity of different dietary Carbohydrates test in relative gnotobiosis with a *streptococcus* producing extracellular polysaccharide. *Helv. Odont. Acta.* **10**, 101~113
  10. Howe, P. R. and R. E. Hatech, 1917. Study of Micro-organisms of Dental Caries. *J. Med.* **36**, 481.
  11. Keyes, P. H., 1968. Research in dental caries. *J. A. D. A.* **76**, 1357~1366.
  12. McIntosh, J. W. W. and Lazarus B. 1922. Initial Investigation into the Etiology of Dental Caries. *Brit. Dent. J.* **43**, 728~739,
  13. Miller, W. D., 1883. Agency of Microorganisms in decay of human teeth *Dental Cosmos.* **25**, Jan. (J. A. D. A. 50. 259~237)
  14. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition. 1974. 490~509