

抗生物質에 對한 *Actinobacillus actinomycetem-comitans*의 感受性 및 糖類添加가 細菌의 成長에 미치는 效果

朴 碩 煥 · 鄭 文 植

서울大學校 保健大學院

Sensitivity of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* to Antibiotics and Effect of Sugar Addition on Growth of the Bacteria

Suak Hwan Park · Moon Shik Zong

School of Public Health, Seoul National University

ABSTRACT

The purpose of the study was to identify the characteristics of the pathogenic microorganism *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. The experiments of this study consist of the decision of existence or nonexistence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the air of dental clinics, the effect of sugar on the growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and the sensitivity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to Fluorine and antibiotics.

The results of the experiments are as follows.

1. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* did not exist in the air of 4 dental clinics in Seoul
2. The growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the media containing glucose or sucrose was faster than in the media without these, and glucose was more effective than sucrose.
3. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* was not susceptible to Fluorine at concentration between 0 ppm and 300 ppm.
4. Order of sensitivity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to antibiotics was as follows: Tetracycline > Kanamycin > Ampicillin.

I. 緒 論

Actinobacillus 屬의 本 菌株 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*는 動物에 疾病을 유발시키는 病原性 細菌으로서, 細菌性 心內膜炎, 腦腫瘍, 尿道減染, 齒周疾患 등에서 발견되어 왔는데, 特히 齒周疾患의 境遇에 口腔內 細菌相(mouth flora)으로 存在하게

된다^{1,2)}

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 一般의 菌株 特性으로는 '은, 그람 陰性菌으로서 CO₂가 증가된 大氣 狀態에서 成長이 促進되며, 形態狀으로는 球菌과 杆菌의 中間 形態를 나타내며, 약 7일간의 培養後에 3-4mm의 주위가 매끄러운 圓形의 菌落(colony)을 形成하고 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*를 實驗動物에 注入한 後 形成되는 抗體의 差異에 따

라 A, B, C-type의 3가지 血清型으로 나눈다.^{3,4)}

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*에 對한 既存의 研究들을 살펴보면 患者를 對象으로 한 臨床의 研究와 實驗 動物을 對象으로 한 免疫學的 研究는 활발히 進行되어 왔으며, 항생물질에 對한 感受性 調査 및 血清型간의, 혹은 다른 種의 成長을 抑制하는 bacteriocin에 對한 研究가 계속되고 있으나⁵⁻⁷⁾, 室內 空氣를 통한 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 傳播 可能性, 洗齒 정도에 따른 細菌數의 水準, 弗素成分의 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*에 對한 影響等 保健學的 側面에서의 接近 試圖는 거의 되어 있지 않다.

이에 本 研究의 目的은 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 大氣中 傳播 및 感染 可能性을 探知하기 위해서 齒科 診療所 內의 大氣中의 細菌數를 測定하고, 口腔內 保健과 關聯하여 糖類中 Glucose 및 Sucrose가 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 成長에 어느 정도로 影響을 미치는가를 알아보기 위해 基本培地 外에 Glucose 및 Sucrose를 添加한 狀態에서의 成長率을 測定, 比較하고, 치아우식증의 豫防手段으로써 齒質의 耐酸性을 強化시키기 위해 使用되는 Fluorine⁸⁾ 및 3가지 抗生物質에 對한 感受性 등을 調査하여, 本 菌株 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*에 의해 誘發될 수 있는 각종 疾患의 保健學的 側面에서의 豫防 및 治療에 필요한 基礎 資料를 提供하는데 그 目的이 있다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

(1) 菌株

本 實驗에서 使用된 菌株는 齒周炎 患者의 잇몸으로부터 試料를 採取하여 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 選擇 培地에 옮겨 10% -CO₂-incubator에서 4일간 培養하여 다음과 같은 檢査를 實施한 후 使用하였다. 먼저 選擇 培地에서 자란 菌落을 입체현미경을 통해 觀察한 후, 그람 染色에서 陰性인 가를 確認하였으며, 生化學的인 檢査로는 1% Benzidine dihydrochloride 溶液을 이용한 Benzidine 檢査, Nitrate reduction 有無, Urea 分解 有無, Indole 陽性 有無 등을 檢査하였다.⁹⁾

(2) 選擇培地

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*를 위한 選擇培地의

조제는 Slots 등이 使用한 方法에 따랐으며¹⁰⁾ 그 造成은 Table 1과 같다.

즉, ㉓, ㉔에 증류수를 넣어 1로 맞춘 다음, 1N-NaOH 溶液으로 pH 7.2로 맞추고 滅菌한 다음, Water bath에서 50-60°C까지 식힌후, 여기에 ㉕, ㉖, ㉗를 넣고 混合해서 agar plate에 20ml씩 부어서 使用하였다.

Table 1. Media formula for the selective culture of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Materials	weight or volume per liter
Tryptic Agar	40 g
Yeast Extract	1 g
Bacitracin Stock Solution (7.5mg/ml)	10 ml
Vancomycin Stock Solution (0.5mg/ml)	10 ml
10% Sterile Horse Serum	100 ml

(3) 增殖培地

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 液體培養을 위한 broth media로는 NIH-Thioglycollate broth¹¹⁾를 使用하였으며 그 造成은 Table 2와 같다.

Table 2. Media formula for the broth culture of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
(Unit ; g/l)

Materials	weight
Bacto Casitone	15.0
Bacto Yeast Extract	5.0
Bacto Dextrose	5.5
Sodium Chloride	2.5
L-Cystine	0.5
Sodium Thioglycollate	0.5

(4) 試藥

Fluorine 0.5g을 10ml의 증류수에 녹인 후, 濾過 滅菌하여 이를 Stock solution(50mg/ml)으로 使用하였으며, Ampicillin(Am)과 Kanamycin(Km)의 경우, 증류수 10ml에 각각 250mg을 녹인 후 濾過 滅菌하여 이를 Stock Solution(각각 25mg/ml)으로

使用하였으며, Tetracycline(Tc)의 경우, ethanol/water (50%, v/v) 溶液 10ml에 25mg을 녹인 후, 濾過 滅菌하여 Stock Solution 으로 使用하였다.¹²⁾

2. 方法

(1) 診療所內의 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 分布

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 選擇 培地로 준비된 Agar plate를 서울 시내 所在 齒科 診療所 4곳에 露出 時間을 각각 30분, 1시간, 2시간 大氣中에 露出시킨 다음¹³⁾ 10% -CO₂-incubator에서 36.5℃로 7일간 培養시킨 다음 菌落數를 測定하였다.

(2) Glucose 및 Sucrose의 添加에 따른 成長 率

菌落을 10ml의 液體培地에 接種한 후 2일간 培養하여 이를 순차적으로 10⁶배까지 稀釋하여^{14,15)} 細菌數가 3.6 x 10³개/ml가 되게 한 다음, 이로부터 1ml를 취하여, Glucose 및 Sucrose가 각각 10mg/ml의 濃度로 添加된 9ml의 液體培地에 接種하여 10% -CO₂-incubator에서 36.5℃로 6, 12, 18, 24, 30시간 培養한 후, 각각 培養液을 순차적으로 10¹⁰배까지 稀釋한 후, 각각의 稀釋培地에 따른 稀釋液으로부터 0.5ml씩을 취하여 2개의 寒天 選擇培地에 接種하여 10% -CO₂-incubator에서 36.5℃로 4일간 培養한 후 菌落數를 測定하였다.

(3) Fluorine에 對한 感受性

菌落을 10ml의 液體培地에 接種한 후 2일간 培養하여 100배 稀釋한 다음 이로부터 1ml씩 취하여 Fluorine의 濃度가 0, 50, 100, 150, 200, 250, 그리고 300ppm¹⁶⁾이 包含된 液體培地에 接種한 후 (9.2x10⁶개/ml), 이를 다시 같은 濃도의 Fluorine을 含有한 液體培地에 순차적으로 10⁷배까지 稀釋한 후, 각각의 稀釋 倍數에 따른 稀釋液으로부터 0.5ml씩을 취하여 같은 濃度の Fluorine을 含有한 2개의 寒天 選擇培地에 接種한 후, 10% -CO₂-incubator에서 36.5℃로 4일간 培養한 후 菌落數를 測定하였다.

(4) 抗生物質에 대한 感受性

菌落을 10ml의 液體培地에 接種한 후 2일간 培養하여 100배 稀釋한 다음, 이로부터 1ml씩 취하여 Tetracycline(Tc)의 濃度가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 그리고 10 μg/ml이 포함된 液體培地에 接種한 후

(9.2x10⁶개/ml), 이를 다시 같은 濃度の 抗生物質을 含有한 液體培地에 순차적으로 10⁷배까지 稀釋한 후, 각각의 稀釋倍數에 따른 稀釋液으로부터 0.5ml씩 취하여 같은 濃度の 抗生物質을 含有한 2개의 寒天 選擇培地에 接種하여 10% -CO₂-incubator에서 36.5℃로 4일간 培養한 후 菌落數를 測定하였다.

III. 結果 및 考察

1. 診療所內의 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 分포

서울 시내 소재 齒科診療所 4곳에서 露出시간에 따른 菌落의 數는 Table 3과 같다.

Table 3. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the air of dental clinic.

Site	Exposure time (min)	Number of colonies		
		<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Other bacteria	Fungi
A	30	-	-	-
	60	-	-	3
	120	-	2	++ + ¹⁾
B	30	-	-	-
	60	-	-	-
	120	-	-	-
C	30	-	-	-
	60	-	-	-
	120	-	-	1
D	30	-	-	-
	70	-	-	-
	120	-	1	3

1) 100 many colonies to count

CO₂가 존재하는 곳에서 더 잘자라는 通性 嫌氣性 細菌인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*¹⁷⁾ 공기를 통한 傳播는 보고되어 있지 않으며, 본 연구에서 7일간 培養이 끝난 후, 입체현미경(stereoscope)을 통해 菌落數를 觀察해 본 結果, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*는 4곳 중 어느 곳에서도 發見되지 않아 이 細菌이 공기에 의해 傳播될 可能性은 稀薄한 것으로 나타났지만, 장소 A의 경우 60분-한천 선택배지에서 직경 1.2cm의 곰팡이가 3개 발견되었

Table 4. Effect of sugar addition on growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Concentration of sugar(mg/ml)	Times after addition	Number of Microorganisms					
		0	6	12	18	24	30
Control		3.6×10^2	5.2×10^2	6.7×10^2	1.2×10^3	1.7×10^4	7.8×10^5
Glucose 10		3.6×10^2	6.4×10^2	7.8×10^2	2.1×10^3	2.5×10^5	1.3×10^8
Sucrose 10		3.6×10^2	5.1×10^2	7.2×10^2	1.4×10^3	6.5×10^4	2.5×10^6

으며, 120분-한천선택 배지에서는 빨간색(0.5cm)과 주황색(0.4cm)의 菌落 이 형성되었고 대부분의 면적을 곰팡이가 뒤덮고 있어서 그 숫자를 셀 수가 없었다. 장소 B에서는 菌落 이 전혀 나타나지 않아 相對的으로 診療室內 衛生狀態가 良好함을 나타냈으며, 장소 C에서는 곰팡이가 1개, 장소 D에서는 주황색의 菌落 1개와 곰팡이 3개가 觀察되었다.

2. Glucose 및 Sucrose의 添加에 따른 成長率

Glucose 및 Sucrose의 添加에 따른 細菌數의 增加는 Table 4와 같으며, 이를 그래프로 나타내면 Fig. 1과 같다.

Table 4 및 Fig. 1에서 보는 바와 같이 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 成長率은 糖類 添加에 의해 增加되었으며 sucrose보다는 glucose의 경우가 더 效果가 큰 것으로 나타났다. 따라서 口腔 保健과 관련하여 口腔內 糖類가 존재하는 경우가 그렇지 않은 경우보다 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 增殖이 더 용이하다는 것을 간접적으로 알 수 있었다.

3. Fluorine에 對한 感受性

Fluorine은 齒質의 耐酸性을 增加시켜 치아우식 증을 豫防하는데 사용되어 왔으며, 실제로 1945년 이후 미국 및 캐나다의 여러개 주에서 0.8-1.2ppm의 濃度로 上水道에 注入하고 있으며, 이에 의해 口腔內 細菌數도 減少한다고 報告되어 있다. (8, 18)

한편 그 濃度가 100ppm이상의 高 濃度에서는 弗素沈着症(Fluorosis)을 誘發하기도 하는데^{19, 20)} 각각의 Fluorine 濃度에서의 細菌數는 Table 5와 같다.

Table 5에서 보는 바와 같이, 본 實驗시 使用한 Fluorine의 濃度는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의

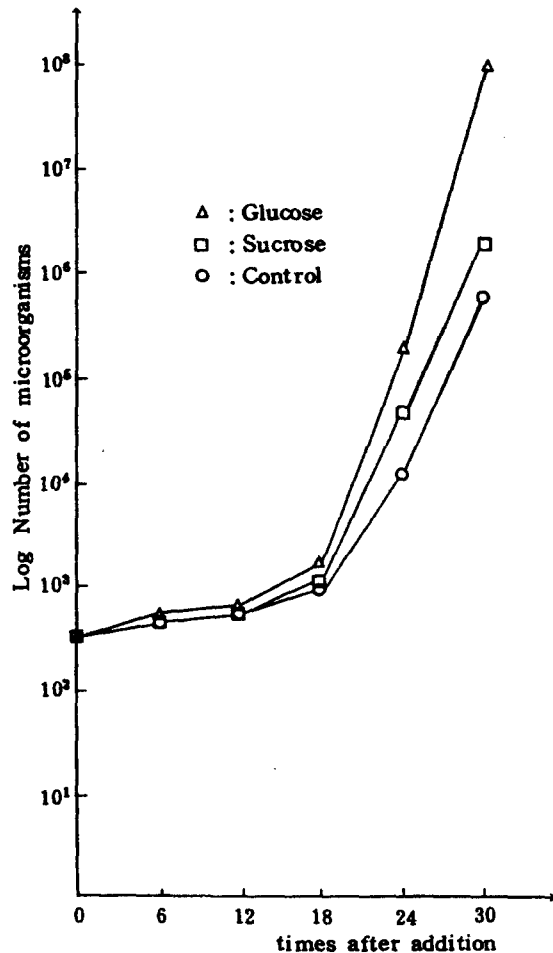


Fig. 1. Effect of sugar addition on growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

成長에 거의 影響을 미치지 않음을 알 수 있었다. 그러므로 실제로 上水道에 適用하는 Fluorine의 濃度 1.2ppm으로는 이 細菌의 成長을 抑制할 수 없다는 것을 알 수 있었으나, 弗素深着症을 일으키

는 濃度인 100ppm 이상에서도 별 抑制效果가 없기 때문에 Fluorine의 注入으로 本 細菌을 除去하기는 不可能하다는 것을 알 수 있었다.

4. 抗生物質에 對한 感受性

含有된 Tetracycline에 對한 菌의 感受性은 Table 6 및 Fig. 2와 같고, Ampicillin과 Kanamycin에 對한 菌의 感受性은 Table 7 및 Fig. 3에서 보는 바와 같다.

이 資料로 부터, Penicillin의 變型體로 細胞壁 合成의 最終 段階의 反應을 禁止시킴으로서 成長하는 細胞를 죽이는 Ampicillin²¹⁾의 경우 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Table 5. Effect of fluorine on growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Fluorine concentration (ppm)	Number of microorganisms
control	9.2×10^6
50	1.0×10^7
100	8.8×10^6
150	9.4×10^6
200	8.4×10^6
250	1.0×10^7
300	9.8×10^6

Table 6. Effect of tetracycline on growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Tetracycline concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Number of microorganisms
control	9.2×10^6
1	3.2×10^6
2	7.8×10^3
3	3.4×10^2
4	4
5	0

Table 7. Effect of antibiotics on growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Antibiotic concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Number of microorganisms	
	Ampicillin	Kanamycin
Control	9.2×10^6	9.2×10^6
20	1.2×10^6	2.6×10^5
40	1.4×10^5	8.2×10^8
60	8.6×10^3	8.8×10^2
80	1.6×10^3	1.4×10^1
100	9.4×10^1	0
120	6	
140	0	

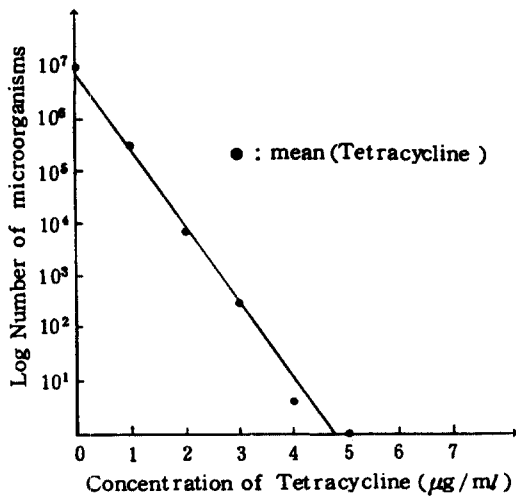


Fig. 2. Effect of tetracycline on growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

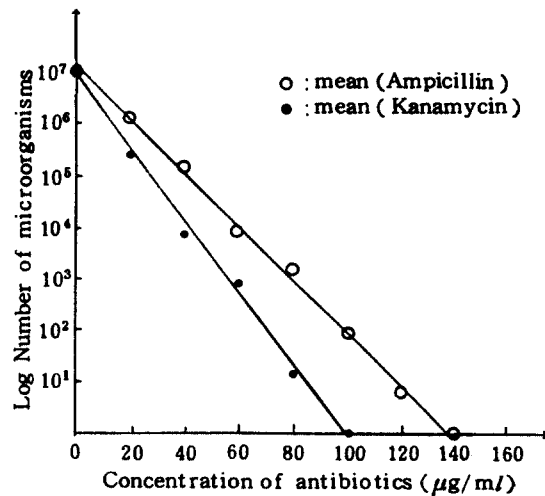


Fig. 3. Effect of antibiotics on growth of *Actinebacillus actinomycetemcomitans*

의 濃度에서 100%의 成長禁止效果를 나타내었고, 70S-ribosome에 結合하여 m-RNA上的 遺傳情報를 잘못 解讀케 하여 결국 細胞를 죽게 하는 Kanamycin²¹⁾의 경우는 100 μg/ml의 濃度에서 100%의 成長禁止效果를 보인 반면에, ribosome의 30S-subunit에 結合하여 蛋白質 合成을 妨害하여 細胞를 죽이는 Tetracycline^{21, 22)}의 경우에는 5 μg/ml의 濃度에서 100%의 成長禁止效果를 나타내었는데, 이는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*에 對한 抗生物質의 效果에 있어서 Tetracycline이 가장 우수하다고 주장한 Slots 등의 研究와^{23, 24)} 일치하였으며, 결국 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*와 관련된 細菌性 心內膜炎, 腦腫傷, 尿道感染, 齒周疾患 등의 治療에 Tetracycline의 使用이 큰 效果를 나타낼 수 있을 것으로 思料된다.

IV. 要約 및 結論

病院性 微生物 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 保健學的 特性에 關한 研究로서 診療所內의 分布, 糖類의 添加에 따른 成長率, Fluorine에 對한 感受性, 抗生物質에 對한 感受性 등의 實驗 效果는 다음과 같다.

1. 서울市內 所在 4곳의 齒科診療所內 大氣中에서는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*가 發見되지 않았다.

2. 培地에 糖類를 添加했을 경우에 그렇지 않은 경우보다 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*가 더 잘 자랐으며 그 程度는 Glucose가 Sucrose보다도 컸다.

3. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*는 0-300ppm 濃度의 Fluorine에 對해서 感受性を 보이지 아니하였다.

4. 抗生物質에 對한 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 感受性の 程度는 Tetracycline > Kanamycin > Ampicillin 順으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Lennette, E.H., et al. : Manual of clinical microbiology. 4th ed. Washington, D.C. 312-313, 1985.
2. Slots, J., Genco, R.J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J.

- Dental. Rea., 63:412-421, 1984.
3. Stainer, R.Y., et al. : The microbial world. 5th ed. Prentice-Hall, New Jersey, 673-679, 1986.
4. Singleton, P., Sainsbury, D. : Dictionary of microbiology and molecular biology. 2nd ed. A Willey-Interscience publication, 8-11, 1987.
5. Ebersole, J.L., et al. : Human immune response to oral microorganisms associated with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Clin. Exper. Immun., 47:43, 1982.
6. Ranney, R.R., et al. : relationship between attachment loss and precipitating serum antibody to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* J. Periodontol., 53:11, 1982.
7. Moore, W.E., et al. : Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. Infect. Immun., 48 : 507, 1985.
8. 金周煥, 金種培, 崔有鎭 : 口腔 保健學. 高文社, 서울, 52-64, 1986.
9. Krieg, N.R., and Holt, J.G. : Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, 570-574, 1984.
10. Slots, J. : Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Clin. Microbiol., 15 : 606, 1982.
11. Difco Laboratories. : Difco Manual. 152-153, 1984.
12. Maniatis, T., et al. : molecular Cloning-a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 71-73, 1982
13. Edmond, R.L. : Aerobiology-the ecological system approach. Dowden, Hutchinson, and Ross Inc, Pennsylvania, 152-155, 1981.
14. Mitchell, R. : Introduction to environmental microbiology. Prentice-Hall Inc, New Jersey, 34-37, 1974.
15. Benson, H.J. : Microbiological application-a laboratory manual in general microbiology. 2nd ed. 186-190, 1982.
16. Amdur, M.O. : Toxicology of pesticides, 448, 1985.
17. Lennette, E.H., et al. : Manual of clinical

- microbiology. 4th ed. Washington, D.C. 316, 1985.
18. National Research Council : Drinking Water and Health. National Academy of Science, Washington, D.C. Vol.3. 28-31, 1980.
 19. Miller, I.J. : Fluorides and dental fluorosis. Int. Dent. J., 32 : 135-147, 1982.
 20. Soomoonsa : English-Korean medical dictionary. Seoul. 794, 1989.
 21. Crueger, W., and Crueger, A. : Biotechnology in antibiotics. Science Tech. inc., USA, 197-209, 1984.
 22. Maniatis, t., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. : Molecular cloning-a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory, USA, 73, 1982.
 23. Slots, J., Evans, R.T., Lobbins, P.M., and Genco, R.J. : Invitro antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Antimicrob. Agents Chemother., 18 : 9-12, 1980.
 24. Son Seong-Heui, Choi Sang-Mook, and Han Soo-Bu : The prevalence and antibiotic susceptibility of Capnocytophaga and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* J. Kor. Den. Assoc., Vol. 24, No. 11: 961-965, 1986.