

Effect of Sub-Minimal Inhibitory Concentrations of Antibiotics on Biofilm Formation and Coaggregation of Streptococci and Actinomyces

So Yeon Lee and Si Young Lee*

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea

(received November 11, 2015; revised November 24, 2015; accepted November 24, 2015)

Minimal inhibitory concentration (MIC) is the lowest antibiotic concentration that inhibits the visible growth of bacteria. Sub-minimal inhibitory concentration (Sub-MIC) is defined as the concentration of an antimicrobial agent that does not have an effect on bacterial growth but can alter bacterial biochemistry, thus reducing bacterial virulence. Many studies have confirmed that sub-MICs of antibiotics can inhibit bacterial virulence factors. However, most studies were focused on Gram-negative bacteria, while few studies on the effect of sub-MICs of antibiotics on Gram-positive bacteria. In this study, we examined the influence of sub-MICs of doxycycline, tetracycline, penicillin and amoxicillin on biofilm formation and coaggregation of *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, and *Actinomyces odontolyticus*. In this study, incubation with sub-MIC of antibiotics had no effect on the biofilm formation of *S. gordonii* and *A. naeslundii*. However, *S. mutans* showed increased biofilm formation after incubation with sub-MIC amoxicillin and penicillin. Also, the biofilm formation of *A. odontolyticus* was increased after

incubating with sub-MIC penicillin. Coaggregation of *A. naeslundii* with *S. gordonii* and *A. odontolyticus* was diminished by sub-MIC amoxicillin. These observations indicated that sub-MICs of antibiotics could affect variable virulence properties such as biofilm formation and coaggregation in Gram-positive oral bacteria.

Key words: antibiotic, biofilm, oral bacteria, hydrophobicity, coaggregation, sub-MIC

서론

항생제의 최소억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)는 세균의 성장을 억제하는 항생제의 가장 낮은 농도이다. 항생제의 농도가 지속적으로 MIC 이상으로 유지되는 경우 항생제의 효과가 최적이지만, 항생제 복용 후 주기적으로 투여하지 않는다면 항생제 농도는 일정 기간에서만 MIC 이상 농도로 유지되는 것으로 알려져 있다 [1,2]. MIC 이상의 농도로 유지되는 기간 후, 항생제의 농도는 MIC보다 더 낮아지게 되고 이것을 최소 억제 농도 이하의 농도(sub-MIC)라고 부른다[1]. 비록 sub-MIC의 항생제가 세균을 죽이지는 못하지만, 세균의 생화학적 특성과 세균 표면의 가장 바깥쪽 구조, 세균 응집, 세균 체표 소수성, 숙주-세균의 상호작용과 같은 세균의 중요한 기능에 영향을 미치는 능력을 가지며, 이로 인하여 세균의 병독성 요인의 변화를 가져온다고 보고되고 있다[1,3-6].

몇몇 연구에서 항생제의 sub-MIC가 효과적으로 바이오필름 형성을 억제할 수 있음을 보고하였고, 항생제의

*Correspondence to: Si Young Lee, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea.
Tel.: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410,
E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

sub-MIC에서 성장시킨 세균은 세균 간의 응집이 감소한다는 것을 보여주었다[7,8]. Gibbons는 구강 세균을 이용한 연구에서, tetracycline, clindamycin의 sub-MIC에서 성장시킨 *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonsa gingivalis*, *Capnocytophaga ochraceus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*의 획득 피막에 대한 부착이 감소했다는 것을 밝혔다[8]. Svanborg 등은 sub-MIC의 ampicillin 혹은 amoxicillin이 첨가된 배양 배지에서 성장시킨 *Escherichia coli*는 항생제를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 세균의 형태가 변형되었고, 세균의 부착 능력이 억제되었다고 밝혔다[9]. 또한, sub-MIC의 cefodizime이 첨가된 배양 배지에서 성장시킨 *E. coli*는 인간 상피세포에 부착하는 능력이 감소하였다고 보고되었다[1]. 그러나 Dong 등의 연구에서는 chlorhexidine과 sodium fluoride의 sub-MIC에서 성장시킨 *S. mutans*가 바이오필름 형성과 관련된 유전자 발현을 유도하고 바이오필름 발달을 촉진할 수 있다는 것을 보여주었다[10].

구강 세균의 공동응집(coaggregation)은 다양한 세균 종에서 관찰된다[11,12]. 구강 내 치태 형성은 구강 그람 양성 세균과 후기 그람 양성 균집자들 사이의 순간 공동응집에 의해 부분적으로 매개되는 것으로 알려져 있으며[13], 치태(dental plaque)와 관련된 다중 세균 바이오필름 형성의 중요한 과정으로 간주되고 있다[14].

지금까지 항생제의 sub-MIC에서 세균 병독성 효과에 대해 여러 연구가 진행되었지만, 대부분 그람 음성 구강 세균에 대한 연구였으며, 구강질환과 연관이 있는 그람 양성 구강 세균을 대상으로 항생제의 sub-MIC의 존재 하에서 세균 병독성의 변화가 어떻게 나타나는지에 대한 연구는 많지 않다. 본 연구에서는 치과에서 일반적으로 사용하는 항생제인 doxycycline, tetracycline, penicillin, amoxicillin을 대상으로 이들 항생제의 sub-MIC가 그람 양성 구강 세균인 *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *S. gordonii*, *S. mutans*의 바이오필름 형성 및 세균 공동 응집 양상에 대하여 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다.

재료 및 방법

세균 및 배양

본 연구에서는 *S. gordonii* DL1, *S. mutans* ATCC 25175, *A. naeslundii* CCUG 35333, *A. odontolyticus* ATCC 17929를 사용하였다. 세균 배양을 위해 Brain Heart Infusion (BHI) broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 사용하였으며 37°C, 5% CO₂가 보충된 배양기에서 18시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다. 세균 혼탁도는 분광광도계를 사용하여 660 nm (OD₆₆₀)에서 측정하였고, 미리 정해

놓은 세균 대 OD값의 표준 곡선에 적용하여 세균 수를 정량하였다.

항생제 MIC 측정

실험에 사용한 균주에 대한 항생제 MIC 측정은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에서 권고하는 액체 배지 희석법을 이용하였다[15]. 실험에 사용한 항생제는 치과에서 일반적으로 사용되고 있는 doxycycline, tetracycline, penicillin, amoxicillin을 사용하였다. MIC는 two-fold serial macro-dilution 법으로 측정하였다. 세균 배양 배지에 항생제를 1/2씩 연속 희석한 후 세균을 5×10^5 cells/ml이 되도록 접종하고, 37°C, 5% CO₂가 보충된 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 육안으로 관찰하여 세균 성장이 억제된 MIC를 측정하였다.

바이오필름 형성 실험

바이오필름 형성은 기존에 보고된 논문의 방법을 약간 변형하여 실험하였다[16]. 실험에 사용한 세균은 CO₂ 배양기에서 18시간 배양 후, 분광광도계를 사용하여 660nm (OD₆₆₀)에서 탁도를 측정하고 PBS (pH7.4)로 희석하여 1×10^9 CFU/ml의 세균 현탁액을 얻었다. 세균은 멸균된 glass slip (round, 12 mm diameter)이 들어있는 12-well plates (SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea)에 배양되었다. 12-well plate에 4 ml의 세균 배양 배지와 25 µl의 세균 현탁액을 첨가하고 CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. 배양 후, 바이오필름이 형성된 glass slip은 멸균된 PBS로 약하게 씻어 glass slip에 부착하지 않은 세균을 제거하였다. 바이오필름 형성 양상은 glass slip에 부착하는 정도에 따라 1-4로 점수를 부여하였고, 아래의 Table 1에 점수 기준을 표시하였다.

바이오필름 형성에 대한 sub-MIC 항생제의 영향을 조사하기 위하여 세균을 doxycycline, tetracycline, penicillin, amoxicillin의 sub-MIC의 농도에서 배양시켜 위와 같은 방법으로 조사하였다.

세균 표면 소수성 실험

세균의 바이오필름 형성 정도의 차이가 세균 체표 소수성의 차이에 의한 것인지를 조사하기 위하여 기존에 알려진 방법을 이용하여 소수성을 측정하였다[17]. 세포 표면 소수성 측정은 n-hexadecane에 세균이 흡착될 수 있는 능력을 측정함으로써 결정하였다. 각 항생제의 sub-MIC에서 배양된 세균은 10,000 x g에서 5분 동안 원심 분리하고 PUM 완충액[18]으로 2번 세척하였다. 세척한 세균은 같은 완충액에 현탁 하였으며 세균 현탁액

은 OD₅₅₀에서 1.0 (1 × 10⁹ cells/ml)이 되도록 맞추었다. 2 ml의 세균 현탁액을 유리 튜브(13 mm)에 넣은 뒤 400 µl의 n-hexadecane (Sigma chemicals Co., St. Louis, MO, USA)을 첨가하고, 이 혼합액을 교반기에서 60초 동안 격렬하게 섞어주었다. 그런 다음, 상온에서 15분 동안 방치한 후 상층액을 덜어내어 550nm (OD₅₅₀)에서 측정하였다. 소수성(HP)은 다음과 같은 공식을 이용하여 계산하였다. %HP = [OD (initial)-OD (expt)] × 100 / OD (initial); 여기서 OD (expt)는 n-hexadecane을 첨가하고 15분 배양한 후 측정한 OD₅₅₀값을 말한다.

세균 공동응집 실험

공동응집 실험은 Cisar 등이 보고한 실험 방법을 사용하였고, 육안을 이용하여 결과를 확인하였다[12,19,20]. 각 sub-MIC 농도의 항생제를 첨가한 BHI 액체 배지에 실험 균을 접종하여 18시간 배양한 후, 12,000 x g에서 5분 간 원심 분리하였다. 원심 분리 후, 세균을 PBS (pH 7.4)로 현탁하고 분광광도계(OD₆₆₀)로 측정하여 1 × 10⁹ CFU/ml 로 맞추었다. 유리 튜브(13 mm)에 각 세균을 0.1 ml씩 넣고, 적어도 10초 이상 교반기에서 섞어 주었다. 실온에서 1시간 방치한 후, 응집 결과를 확인하고 아래의 기준으로 점수화 하였다.

0 : 육안으로 응집반응 보이지 않음, 1 : 작은 응집물이 현탁액 속에 보임, 2 : 응집물이 보이거나 현탁액은 여전히 탁함, 3 : 큰 응집물이 즉시 가라앉고 상층액은 약간 탁함,

4 : 큰 응집물이 즉시 가라앉고 상층액은 맑음.

통계 분석

실험에 사용한 세균 간의 소수성 차이가 통계적으로 유의한지 확인하기 위하여 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis 법을 사용하였다(유의확률 p < 0.05). 통계 분석은 Software Package for Social Sciences (SPSS, version 21, IBM Inc., USA)를 사용하여 수행하였다.

결 과

항생제의 MIC 측정

항생제의 MIC는 아래의 Table 1에 표시되었다. 실험에 사용한 항생제의 농도는 MIC 값의 1/2을 사용하였다.

바이오필름 형성 실험

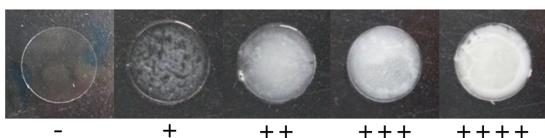
각 실험 균주의 바이오필름 형성 양상은 Table 2에 나타내었다. 항생제를 처리하지 않은 대조군에서 *S. gordonii*는 바이오필름 형성이 +1로 관찰되었으며, doxycycline, tetracycline, penicillin, amoxicillin의 sub-MIC 존재 하에 성장시킨 실험군에서 바이오필름 형성 양상에 변화가 없었다. *S. mutans*도 항생제를 처리하지 않은 대조군에서 바이오필름 형성이 +1로 관찰되었으며, penicillin의 sub-MIC에서 바이오필름 형성이 +2로 다소 증가하는 양상을 보였고,

Table 1. The minimal inhibitory concentrations of antibiotics

	MIC (µg/ml)			
	Doxycycline	Tetracycline	Penicillin	Amoxicillin
<i>S. gordonii</i>	0.25	0.25	0.00782	0.03125
<i>S. mutans</i>	0.25	0.25	0.03125	0.25
<i>A. naeslundii</i>	0.0625	0.0625	0.03125	0.0625
<i>A. odontolyticus</i>	0.025	0.025	0.03125	0.125

Table 2. The effect of sub-MIC antibiotics on biofilm formation

	No Antibiotic	Doxycycline	Tetracycline	Penicillin	Amoxicillin
<i>S. gordonii</i>	+	+	+	+	+
<i>S. mutans</i>	+	+	+	++	+++
<i>A. naeslundii</i>	++++	++++	++++	+++	+++
<i>A. odontolyticus</i>	+	+	+	+++	+



sub-MIC의 amoxicillin에서는 바이오필름 형성이 +3으로 증가한 것으로 관찰되었다. Doxycycline, tetracycline의 sub-MIC의 배양액에서 자란 실험군에서는 변화가 없었다. 항생제를 첨가하지 않은 대조군에서 *A. naeslundii*는 바이오필름 형성이 +4로 높게 관찰되었고, 각 항생제를 처리한 실험군에서 차이가 관찰되지 않았다. *A. odontolyticus*는 항생제를 처리하지 않은 대조군에서 바이오필름 형성이 +1로 관찰되었으며, penicillin을 처리하였을 때 바이오필름 형성이 +3으로 증가한 것으로 관찰되었으나, penicillin을 제외한 다른 항생제에서는 대조군과 차이가 없었다.

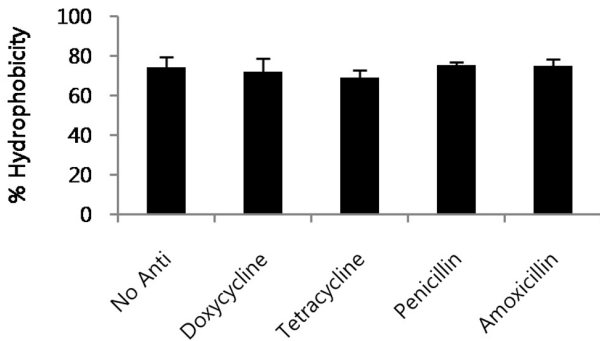
세균 표면 소수성 실험

세균 표면의 소수성은 각 세균 종 사이에 차이를 보였다(Fig. 1). *S. gordonii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*는 60-80%로 높은 소수성을 나타냈으나, *S. mutans*는 다른 세균과 달리 상대적으로 낮은 소수성을 보였다. 항생제를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 각 항생제의 sub-MIC의 존재 하에 성장시킨 실험 군주 사이에 뚜렷한 세균 체표 소수성 차이는 관찰되지 않았으며, 통계적으로 유의하지 않았다($p > 0.05$).

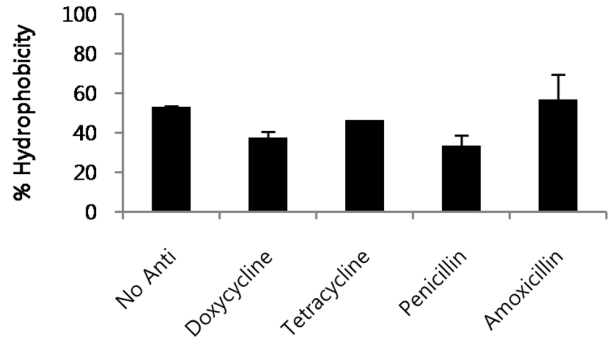
세균 공동응집 실험

항생제를 처리하지 않은 세균을 대상으로 공동 응집 실험을 한 결과는 Table 3에서 볼 수 있듯이, *S. gordonii*와 *A. naeslundii* 간의 조합과, *A. naeslundii*와 *A. odontolyticus* 사이 공동 응집이 +4로 높게 관찰되었다. 이 결과를 바탕으로, doxycycline, tetracycline, penicillin, amoxicillin의 sub-MIC 항생제에서 성장시킨 *S. gordonii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*에서 공동 응집이 어떠한 양상으로 변화하는지 조사하였다. Amoxicillin의 sub-MIC에서 성장시킨 *A. naeslundii*와 *A. odontolyticus*에서 공동응집이 +4에서 +2로 감소한 것으로 관찰되었으며(Table 4), amoxicillin의 sub-MIC에서 성장시킨 *A. naeslundii*와 doxycycline, tetracycline, penicillin의 sub-MIC에서 성장시킨 *S. gordonii* 사이에서 공동 응집이 일어나지 않거나 +1로 감소한 것으로 나타났다. 그러나 amoxicillin의 sub-MIC에서 배양시킨 *A. naeslundii*와 *S. gordonii*사이에서 공동 응집은 +4로 변화가 없었다. Doxycycline, tetracycline, penicillin, amoxicillin의 sub-MIC에서 성장시킨 *A. naeslundii*와 *A. odontolyticus* 사이 공동 응집은 *A. naeslundii*와 *S. gordonii*의 공동 응집 결과와 마찬가지로, amoxicillin의 sub-MIC에서 성장시킨

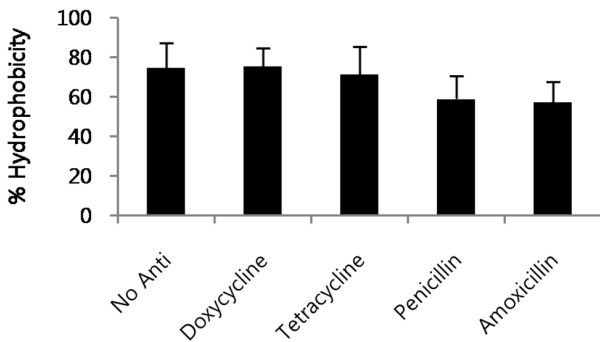
A. *S. gordonii*



B. *S. mutans*



C. *A. naeslundii*



D. *A. odontolyticus*

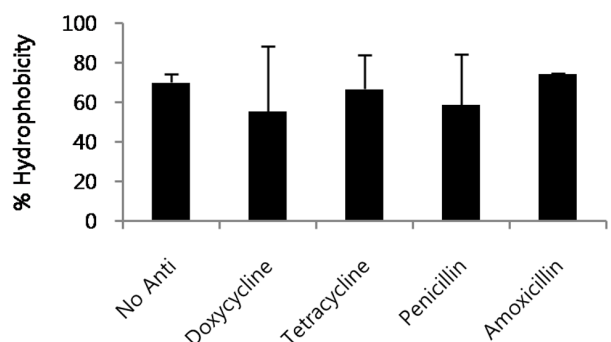


Fig. 1. The effect of sub-MIC antibiotics on hydrophobicity of *S. gordonii*, *S. mutans*, *A. naeslundii* and *A. odontolyticus*. The bacteria were incubated with the sub-MIC antibiotics and hydrophobicity was measured. Values indicate means of two experiments; standard deviations of the mean (error bars) are indicated by vertical lines.

Table 3. Coaggregation of *S. gordonii*, *S. mutans*, *A. naeslundii* and *A. odontolyticus*

	<i>S. gordonii</i>	<i>S. mutans</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>A. odontolyticus</i>
<i>S. gordonii</i>	-	+	++++	-
<i>S. mutans</i>		-	+	-
<i>A. naeslundii</i>			-	++++
<i>A. odontolyticus</i>				-

Table 4. The effect of sub-MIC antibiotics on coaggregation of *A. naeslundii* with *S. gordonii* and *A. odontolyticus*

	<i>A. naeslundii</i>				
	No Anti	Doxycycline	Tetracycline	Penicillin	Amoxicillin
<i>S. gordonii</i>					
No Anti	++++	++++	++++	+++	-
Doxycycline	+++	++++	++++	+++	-
Tetracycline	+++	++++	+++	+++	+
Penicillin	+++	+++	+++	+++	-
Amoxicillin	++++	++++	++++	++++	++++
<i>A. odontolyticus</i>					
No Anti	++++	++++	+++	+++	++
Doxycycline	+++	+++	++++	+++	++
Tetracycline	+++	++++	+++	++	++
Penicillin	+++	+++	+++	+++	++
Amoxicillin	++++	++	++++	+++	++

*A. naeslundii*와 doxycycline, tetracycline, penicillin, amoxicillin의 sub-MIC에서 성장시킨 *A. odontolyticus* 사이에 공동 응집이 +2로 감소한 것으로 관찰되었다.

고찰

여러 구강질환들은 감수성을 가진 숙주에서 세균 병독성 인자들의 활성화로 발생한다. 또한 부착과 같은 병독성 인자들이 세균 군집화와 감염에서 중요한 전제 조건이 된다[21]. 항생제의 sub-MIC는 세균 병독성 인자나, 미생물-숙주 상호작용 변화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 여러 연구에서 항생제의 sub-MIC에서 자란 세균은 세포 표면에 잘 부착하지 못하는 것을 보여주었다[8,22]. Gibbons의 연구에 따르면, sub-MIC의 tetracycline이 첨가된 배지에서 성장시킨 *A. viscosus*와 *P. gingivalis* 세포를 전자 현미경으로 관찰한 결과, 세균 표면에 항생제 없이 배양한 세균에 비하여 적은 수의 fimbriae 혹은 pili를 보였고, 이러한 이유로 항생제의

sub-MIC 농도가 세균의 획득 피막에 대한 부착을 감소시켰을 것이라고 보고하였다[8].

그러나 다른 연구에서는 항생제의 sub-MIC가 세균의 바이오필름 형성을 유도할 수 있음을 나타냈다[10,23]. Dong 등의 연구에서는, *S. mutans*의 경우에 chlorhexidine과 sodium fluoride의 sub-MIC에서 성장시킨 후 증가된 세포 외 기질과 조밀한 바이오필름을 형성했다고 보고하였다[10]. 또한, Frank 등의 연구에서 *Staphylococcus legdunensis*를 대상으로 sub-MIC의 nafcillin에서 성장시켰을 때 바이오필름 형성을 유도하는 것으로 보고하였다[23]. 본 연구 결과에서도 항생제를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 sub-MIC의 penicillin과 amoxicillin이 첨가된 배지에서 성장한 *S. mutans*와 amoxicillin의 sub-MIC의 존재 하에 성장한 *A. odontolyticus*에서 바이오필름 형성이 증가한 것으로 관찰되었다. Dong 등의 연구에서 sub-MIC의 chlorhexidine과 sodium fluoride 처리 시 *S. mutans*의 바이오필름 형성이 증가하는 양상을 보인 바와 같이, 우리의 연구에서도 sub-MIC의 amoxicillin과 penicillin이 *S. mutans*의 바이오필름 형성을 증가시켰다.

세포 소수성은 치아 획득 피막, 상피 또는 보철 의치에 부착할 수 있는 세균 병독성과 가깝게 연관되어 있는 것으로 알려져 있다[21]. 구강 세균의 n-hexadecane에 흡착하는 능력에 의해 결정된 세균의 표면 소수성은 세균마다 서로 다른 것으로 밝혀졌다[24,25]. Okamoto 등의 연구에서 sub-MIC의 penicillin G가 첨가된 배양 배지에서 성장시킨 *Fusobacterium nucleatum*은 구강 상피 세포에의 부착이 감소한 것으로 보고되었다. 또한, 실험 대상이 되는 *F. nucleatum*의 모든 종에서 항생제를 처리하지 않은 대조군 및 sub-MIC에서 성장한 분리 균주의 대부분이 친수성의 특성을 보였으나, penicillin G의 sub-MIC에서 성장한 *F. nucleatum*의 일부 종의 표면 성질이 소수성으로 변한 것으로 나타났다[21]. Gibbons와 Etherden에 따르면 *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *P. gingivalis*는 높은 소수성을 나타낸 반면에, *Streptococcus salivarius*, *S. mutans*는 낮은 소수성을 보인 것으로 관찰되었다[24]. 본 연구 결과에 따르면, *S. gordonii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*는 높은 소수성을 보인 반면, *S. mutans*는 앞서 언급한 Gibbons와 Etherden의 연구 결과와 마찬가지로 상대적으로 낮은 소수성을 보였다. 본 연구에서 항생제의 sub-MIC가 어떠한 이유로 바이오필름의 형성을 증가시켰는지는 확실하지 않다. 세균 세포의 소수성의 변화가 바이오필름 형성에 영향을 미칠 수 있을 것으로 추정하여 sub-MIC 항생제의 세균 소수성에의 영향을 조사하였으나, 항생제에 의한 세균 소수성의 변화는 관찰되지 않았다.

본 연구에서 바이오필름 형성 실험 방법은 기존에 보고된 논문의 실험방법을 약간 변형하였다. 바이오필름 형성 후 크리스탈 바이올렛을 사용하여 염색한 후 바이오필름 형성 정도를 조사하는 기존의 실험방법은 실험 과정에서 glass slip에 부착한 바이오필름을 떨어뜨리게 되고 실험 결과에 오차가 많이 발생하였다. 따라서 육안으로 부착 정도를 관찰하는 것이 더 정확하다고 판단하여 본 실험과 같은 방법으로 진행하였다.

구강 세균의 공동 응집은 다양한 세균 종 사이에서 관찰된다[11,12]. Kolenbrander 등에 따르면, 300 균주 이상의 *A. naeslundii*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *Streptococcus oralis*, *S. sanguis*를 대상으로 쌍으로 순간 공동 응집을 테스트한 결과, 90% 이상이 공동 응집 하였다고 밝혔다[11]. Ledder 등의 연구에 따르면, *F. nucleatum*과 *A. naeslundii*, *A. naeslundii*와 *P. gingivalis*, *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*사이 중간 공동 응집이 잘 일어났으며, *A. naeslundii*는 실험 대상이 되는 10종의 균주와 전반적으로 공동 응집하는 것으로 관찰되었다[14]. *Actinomyces*와 같은 그람 양성 구강 세균의 공동 응집 현상은 여러 연구에서 입증되었다[26,27]. 본 연구 결과에서도 다른 구

강 세균에 비해 *A. naeslundii*가 다른 세균과 활발하게 공동 응집하였다. 여러 연구 결과로 짐작해볼 때, *Actinomyces*가 높은 수준으로 공동 응집을 나타낸 것은 fimbriae에 의한 것으로 보인다[27,28]. Peros와 Gibbons는 penicillin의 존재 하에서 배양한 *A. naeslundii*는 상대적으로 적은 수로 응집하였다고 밝혔다[28]. 그들은 항생제가 fimbriae의 발현에 영향을 주는 것뿐만 아니라 세균 표면 성분의 합성을 억제할 수 있고 세포 구성 성분의 방출을 일으킬 수 있다고 보고하였다. 우리의 연구에서도 sub-MIC의 amoxicillin에 의한 공동 응집의 감소가 관찰되었으며, 이는 항생제가 fimbriae의 발현에 영향을 준 것으로 추정된다. 그러나 amoxicillin의 sub-MIC에서 배양한 *A. naeslundii*와 *S. gordonii*의 조합에서 공동 응집은 항생제를 적용하지 않은 대조군과 비교하였을 때 차이가 없었다. 이것은 amoxicillin의 영향이 세균에 따라 차이가 있어 생긴 것으로 생각되나 정확한 기전은 추가 실험을 통하여 밝혀져야 할 것이다.

본 연구에서 amoxicillin의 영향이 다른 항생제에 비해 크게 나타난 것으로 관찰되었다. Amoxicillin의 sub-MIC가 세균에 어떠한 영향을 미쳤는지 자세한 기전을 알 수는 없으나, 세포벽 구성 성분 중 응집에 관여하는 물질의 합성이 저해되어 세균 간 응집이 감소되었을 가능성이 있다. 앞으로 sub-MIC의 amoxicillin이 구강 세균의 부착성질 및 세균 응집에 미치는 영향에 대해 좀 더 알아볼 필요가 있으며, 본 실험에서 사용된 세균 중 이외의 다른 세균 조합을 대상으로 한 추후 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서는 그람 양성 구강세균을 대상으로 바이오필름 형성과 공동 응집 양상에 대한 sub-MIC 항생제의 영향에 대하여 연구하였고, 항생제의 sub-MIC가 이 세균 특성에 영향을 주는 것으로 관찰되었다. 항생제의 MIC는 장기간 유지되는 것이 아니라, 시간 경과에 따라 항생제의 농도는 떨어지게 되며 sub-MIC에 해당하는 기간은 필연적으로 존재하게 된다[1]. 이전의 여러 연구들뿐만 아니라 본 실험의 결과를 보더라도 항생제의 sub-MIC가 세균 병독력에 영향을 미치는 것으로 보인다. 추후에 더 광범위한 연구가 진행되면, sub-MIC 항생제의 구강 내 세균에 대한 생물학적인 영향이 어떠한지의 여부와 이 영향이 세균에 의한 구강 질환 발생에 미치는 효과가 보다 더 확실해 질 것이다.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicting interest.

References

- Braga PC, Sasso MD, Sala MT. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45:15-25. doi: 10.1093/jac/45.1.15.
- Lorian V. Medical relevance of low concentrations of antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1993;31:137-148. doi: 10.1093/jac/31.suppl_D.137.
- Fonseca AP, Extremina C, Fonseca AF, Sousa JC. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2004;53:903-910. doi: 10.1099/jmm.0.45637-0.
- Lorian V, Atkinson B. Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. *Am J Clin Pathol.* 1975;64:678-688.
- Raponi G, Keller N, Overbeek BP, Rozenberg-Arska M, van Kessel KP, Verhoef J. Enhanced phagocytosis of encapsulated *Escherichia coli* strains after exposure to sub-MICs of antibiotics is correlated to changes of the bacterial cell surface. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:332-336.
- Chopra I, Linton A. The antibacterial effects of low concentrations of antibiotics. *Adv Microb Physiol.* 1986;28:211-259. doi: 10.1128/AAC.34.2.332.
- Cerca N, Martins S, Sillankorva S, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R, Azeredo J. Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:8677-8682. doi: 10.1128/AEM.71.12.8677-8682.2005.
- Gibbons RJ. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J Dent Res.* 1984;63:378-385. doi: 10.1177/00220345840630030401.
- Svanborg-Ed'en C, Sandberg T, Alestig K. Decrease in adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells in vitro by subinhibitory concentrations of ampicillin. *Infection.* 1986;6:121 - 124.
- Dong L, Tong Z, Linghu D, Lin Y, Tao R, Liu J, Tian Y, Ni L. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:390-395. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.009.
- Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: Oral bacterial adherence. *J Bacteriol.* 1993;175:3247-3252.
- Lee SY. Effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide on *Porphyromonas gingivalis* hemin binding and coaggregation with oral streptococci. *J Oral Sci.* 2001;43:1-7.
- Gibbons RJ, Nygaard M. Interbacterial aggregation of plaque bacteria. *Arch Oral Biol.* 1970;15:1397-1400.
- Ledder RG, Timperley AS, Friswell MK, Macfarlane S, McBain AJ. Coaggregation between and among human intestinal and oral bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;66:630-636. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00525.x.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, M07-A8, vol.29, no.2, 8th ed., CLSI. Wayne, PA, 2009.
- Park JH, Lee JK, Um HS, Chang BS, Lee SY. A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. *J Periodontal Implant Sci.* 2014;44:79-84. doi: 10.5051/jpis.2014.44.2.79.
- Lee SY, Kim YJ, Kim KK, Choe SJ. Effects of subinhibitory antibiotic concentrations on *Porphyromonas gingivalis* fibrinogen and hemin binding. *Int J Oral Biol.* 1999;24:121-127.
- Hamada N, Watanabe K, Sasakawa C, Yoshikawa M, Yoshimura F, Umemoto T. Construction and characterization of a fimA mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 1994;62:1696-1704.
- Smith RN, Andersen RN, Kolenbrander PE. Inhibition of intergeneric coaggregation among oral bacteria by cetylpyridinium chloride, chlorhexidine digluconate and octenidine dihydrochloride. *J Periodontal Res.* 1991;26:422-428. doi: 10.1111/j.1600-0765.1991.tb01732.x.
- Cisar JO, Kolenbrander PE, McIntire FC. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun.* 1979;24:742-752.
- Ana C, Okamoto, Elerson Gaetti-Jardim Jr., Victor E. Arana-Chavez, Mario J. Avila-Campos. Influence of subinhibitory concentrations of antimicrobials on hydrophobicity, adherence and ultra-structure of *Fusobacterium nucleatum*. *Braz J Microbiol.* 2002;33:178-184.
- Cai S, Simionato MR, Mayer MP, Novo NF, Zelante F. Effects of subinhibitory concentrations of chemical agents on hydrophobicity and in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Caries Res.* 1994;28:335-341. doi:10.1159/000261998.
- Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:888-895. doi: 10.1128/AAC.01052-06.
- Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect Immun.* 1983;41:1190-1196.
- Ellepola AN, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. *Arch Oral Biol.* 1998;43:879-887. doi:10.1016/S0003-9969(98)00064-8.
- Li T, Khah MK, Slavnic S, Johansson I, Stromberg N. Different type 1 fimbrial genes and tropisms of

- commensal and potentially pathogenic *Actinomyces spp.* with different salivary acidic proline-rich protein and statherin ligand specificities. *Infect Immun.* 2001;69:7224-7233. doi: 10.1128/IAI.69.12.7224-7233.2001.
27. Hamada S, Amano A, Kimura S, Nakagawa I, Kawabata S, Morisaki I. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 1998;13:129-138. doi: 10.1111/j.1399-302X.1998.tb00724.x.
28. Peros WJ, Gibbons RJ. Influence of sublethal antibiotic concentrations on bacterial adherence to saliva-treated hydroxyapatite. *Infect Immun.* 1982;35:326-334.