

실험실 일반 장비를 이용한 치과용 유니트 수관 모델 개발

윤혜영 · 이시영[†]

강릉원주대학교 치과대학 구강미생물학교실 및 구강과학연구소

Developing a Dental Unit Waterline Model Using General Laboratory Equipments

Hye Young Yoon and Si Young Lee[†]

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

Water supplied through dental unit waterlines (DUWLs) has been shown to contain high number of bacteria. To reduce the contamination of DUWLs, it is essential to develop effective disinfectants. It is, however, difficult to obtain proper DUWL samples for studies. The purpose of this study was to establish a simple laboratory model for reproducing DUWL biofilms. The bacteria obtained from DUWLs were cultured in R2A liquid medium for 10 days, and then stored at -70°C . This stock was inoculated into R2A liquid medium and incubated in batch mode. After 5 days of culturing, it was inoculated into the biofilm formation model developed in this study. Our biofilm formation model comprised of a beaker containing R2A liquid medium and five glass rods attached to DUWL polyurethane tubing. Biofilm was allowed to form on the stir plate and the medium was replaced every 2 days. After 4 days of biofilm formation in the laboratory model, biofilm thickness, morphological characteristics and distribution of the composing bacteria were examined by confocal laser microscopy and scanning electron microscopy. The mean of biofilm accumulation was 4.68×10^4 colony forming unit/cm² and its thickness was 10~14 μm . In our laboratory model, thick bacterial lumps were observed in some parts of the tubing. To test the suitability of this biofilm model system, the effectiveness of disinfectants such as sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, and chlorhexidine, was examined by their application to the biofilm formed in our model. Lower concentrations of disinfectants were less effective in reducing the count of bacteria constituting the biofilm. These results showed that our DUWL biofilm laboratory model was appropriate for comparison of disinfectant effects. Our laboratory model is expected to be useful for various other purposes in further studies.

Key Words: Biofilms, Dental infection control, Disinfectants, Model, Water microbiology

서론

치과용 유니트 수관(dental unit waterline, DUWL)을 통해 공급되는 물은 환자의 구강에 접촉되며, 치과 의사, 치과 위생사, 치과조무사와 같은 치과종사자들은 치과기구를 통해 발생하는 에어로졸에 항상 노출되어 있다. 직·간접적인 접촉으로 인해 오염된 DUWL의 물은 감염의 원인이 될 수 있기 때문에, 음용수와 같은 수준으로 또는 더 깨끗한 수준

으로 유지되어야 한다. 그러나 여러 연구를 통해 DUWL의 물이 높은 수준으로 세균에 오염되어 있다는 것이 밝혀졌다¹⁻⁷⁾. DUWL의 물에서 검출되는 세균은 대부분 병원성이 낮은 중속영양세균이지만, 종종 *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*와 같은 기회감염성 세균이 검출되면서 DUWL의 물로 인한 병원 내 감염의 가능성이 제기되고 있다⁸⁻¹²⁾. 미국질병관리본부는 DUWL 물의 세균 오염도를 음용수와 같은 수준인 500

Received: June 17, 2016, Revised: July 11, 2016, Accepted: July 12, 2016

ISSN 1598-4478 (Print) / ISSN 2233-7679 (Online)

[†]Correspondence to: Si Young Lee

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, 7 Jukheon-gil, Gangneung 25457, Korea

Tel: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410, E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr

Copyright © 2016 by Journal of Dental Hygiene Science

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

colony forming unit (CFU)/ml 이하로 유지시킬 것을 권고했으며¹³⁾, 미국치과의사협회에서는 이보다 더 엄격한 수준인 200 CFU/ml 이하로 유지하도록 권장하고 있다¹⁴⁾. DUWL 물의 세균 오염도를 권장 수준(≤ 200 CFU/ml)으로 감소시키기 위해서 다양한 방법들이 사용되고 있으며¹⁵⁻¹⁹⁾, 그중 소독제를 사용하여 DUWL을 소독하는 방법이 일관되고 지속적인 항균 효과를 보이는 것으로 나타나고 있다²⁰⁻²⁴⁾. 또 다른 연구에서 소독제의 사용이 DUWL에 형성된 바이오필름을 제거 및 감소시키는 것을 확인하였다^{6,17)}.

새로운 소독제의 효과 확인 및 DUWL의 오염방지와 관련된 연구를 위해서는 바이오필름이 형성되어 있는 수관이 필요하지만, 실험을 위해 실제 임상에서 사용하고 있는 치과용 유니트에서 수관을 제거하여 시료로 사용하기에는 현실적으로 어려운 점이 많다. 일부 연구자들은 DUWL 실험실 모델을 제작하여 DUWL 내 바이오필름을 감소시키는 새로운 방법의 개발을 위해 사용하였다. Walker 등¹⁷⁾은 치과에서 사용되고 있는 소독제품의 효과를 비교하기 위해 DUWL의 실험실 모델을 제작하였다. 이들은 DUWL에 바이오필름을 형성시킬 때 세균을 일정한 비율로 성장시키기 위해 chemostat이라는 특수한 장치를 사용하였다. Lin 등²⁴⁾의 실험실 모델에는 DUWL에 일정한 시간에 일정한 속도로 도시용수를 흘려주기 위해 자동화된 장치를 연결하여 작동시켰다. 그러나 Walker 등¹⁷⁾과 Lin 등²⁴⁾의 모델은 특수적인 장치가 필요하기 때문에 실험실에서 쉽게 재현하기 어렵다는 단점이 있다. 따라서 DUWL에 형성된 바이오필름을 제거하는 효과적인 소독제의 제시와 새로운 소독제의 개발을 위해 실험실에서 쉽게 제작이 가능한 DUWL의 실험실

모델의 확립이 필요하다.

본 연구에서는 실험실 바이오필름을 제작하기 위해 실험실에서 쉽게 구할 수 있는 장비들로 실험실 모델을 제작하여, DUWL 바이오필름을 재현하기 위한 새로운 실험실 모델을 확립하고자 하였다(Fig. 1).

연구대상 및 방법

1. DUWL 세균 수집 및 stock 제작

치과대학 임상실습이 이루어지는 시뮬레이션실에서 사용 중인 4개의 DUWL을 통해 공급되는 물을 멸균된 1 L 유리병에 수집하여 실험실로 가져왔다. 수집한 물을 0.2 μ m 여과지(Millipore, Billerica, MA, USA)에 여과시키고 세균이 모아진 여과지를 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액 20 ml에 현탁하였다. 현탁액 0.5 ml를 R2A 액체배지(Becton; Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 10 ml에 접종 후 25°C에서 10일 동안 배양하였다. 실험에 사용할 세균의 보관을 위하여 10일 배양한 세균 배양액을 1.7 ml micro tube에 1 ml씩 나눠 담아 세균 stock을 제작하였다. 세균 stock은 -70°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

2. DUWL 세균 배양(batch culture)

DUWL 바이오필름을 형성시키는 데 필요한 증식이 활발한 세균배양액을 얻기 위해 -70°C에 보관되어 있는 세균 stock을 R2A 액체배지에서 회분 배양하였다. 세균 stock 0.5 ml를 R2A 액체배지 10 ml에 접종하여 25°C에서 5일간 배양시켰다. 배양하는 동안 24시간마다 배지에 자란 세균액의 CFU/ml를 확인하기 위해 R2A 고체배지(Becton)에 spiral plater (IUL, Barcelona, Spain)를 이용하여 도말하였다. 도말한 R2A 고체배지는 25°C에서 7일간 배양하였다. 배양 후 세균의 집락(colony)은 colony counter (IUL)로 계수하였다.

3. DUWL 모델 제작

DUWL 모델 제작을 위해 내경 2 mm인 폴리우레탄 튜빙(Nitta Moore Corp., Gumi, Korea)을 사용하였다. 폴리우레탄 튜빙은 가로 1 cm로 자르고 세로로 반으로 잘라 사용하였다. 실험에 사용한 폴리우레탄 튜빙은 DUWL에 일반적으로 사용되고 있으며, 실제 치과용 유니트에 사용되는 것과 같은 재질과 같은 직경의 제품을 사용하였다.

실험실에서 쉽게 구할 수 있는 장비를 사용한 바이오필름 모델을 제작하기 위하여, 세로 20 cm, 가로 2 cm 길이의 유

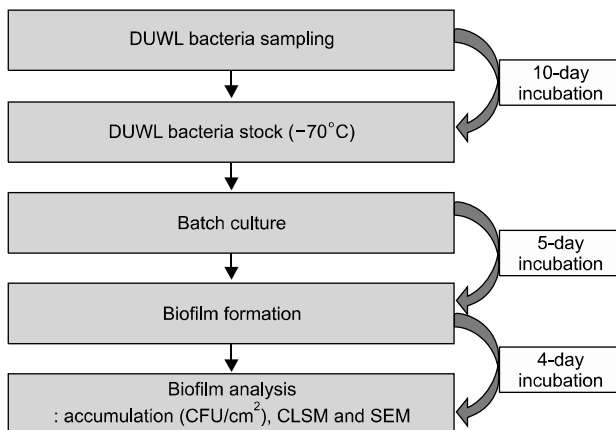


Fig. 1. Schematic diagram of the dental unit waterline (DUWL) modeling process. CFU/cm²: colony forming unit per centimeter². CLSM: confocal laser scanning microscope, SEM: scanning electron microscope.

리막대 한쪽 끝에 양면테이프를 이용하여 폴리우레탄 튜빙을 붙여주었다. 1 L 비커에 magnetic stir bar를 넣고 알루미늄 호일로 비커의 입구를 막아준 뒤 유리막대 두께만큼의 구멍을 냈다. 구멍에 유리막대를 꽂아주고 입구를 한번 더 알루미늄 호일로 막아준 후 121°C에서 15분 동안 멸균시켰다. 그리고 R2A 액체배지 300 ml와 5일 동안 회분 배양한 세균액 50 ml을 넣었다(Fig. 2). Magnetic stirrer를 이용하여 50 rpm으로 와류를 주면서 25°C 배양기에서 배양시켰다. 배양 2일마다 R2A 액체배지를 200 ml씩 교체해주었다. 실제 진료실에서와 유사한 조건에서 바이오필름을 형성하기 위하여 와류상태는 오전 9시부터 오후 6시까지 적용시키고 그 이외의 시간(약 15시간)에는 정체상태로 배양시켰다.

4. 바이오필름 분석

모델에서 형성된 바이오필름의 축적량 및 두께와 바이오필름을 구성하는 세균의 비율 및 형태를 확인하였다.

1) 바이오필름 축적량 분석

바이오필름 축적량 분석은 10일까지 2일 간격으로 수행되었다. 바이오필름 형성 후 폴리우레탄 튜빙을 모델에서 꺼내 바이오필름이 형성된 폴리우레탄 튜빙의 내면을 제외한 면을 70% 에탄올로 닦아주었다. 그 후 느슨하게 부착한 세균을 제거하기 위해 PBS 용액에 2번 세척한 후 바이오필름을 형성시킨 폴리우레탄 튜빙의 내면을 멸균한 dental probe로 긁어서 0.09 mm 유리비드를 넣은 PBS 1 ml에 모아주었다⁵⁾. 내면을 긁은 후 폴리우레탄 튜빙 시료도 함께 PBS 1 ml

에 넣고 와류시켰다. 바이오필름을 분리시킨 용액을 10배수로 희석시켜 희석액을 R2A 고체배지(Becton)에 spiral plater (IUL)를 이용하여 도말하였다. 도말한 R2A 고체배지는 25°C에서 7일 배양하고 세균의 집락을 colony counter (IUL)로 계수한 후 CFU/cm²로 계산하여 비교하였다.

2) 바이오필름 구성 세균 집락 비율

모델에서 형성시킨 바이오필름을 바이오필름 축적량 방법에서 설명한 대로 폴리우레탄 튜빙에서 분리시키고 PBS 용액에 현탁시킨 용액을 R2A 고체배지에 도말 후 25°C에서 7일 배양하였다. 5일 회분배양한 세균 집락수의 비율과 모델에서 형성된 바이오필름의 세균 집락수의 비율을 비교하였다. 배양 후 형성된 세균 집락의 색깔에 따라 각 세균 집락 비율을 측정하였다.

3) 바이오필름 형태 분석

바이오필름의 분포 및 두께와 구성 세균의 형태를 확인하기 위해 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)과 공초점현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM)으로 촬영하였다.

(1) SEM

바이오필름을 구성하는 세균의 형태를 확인하기 위해 UHR-SEM (Hitachi, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 모델에서 바이오필름을 형성한 폴리우레탄 튜빙 조각을 2.5% glutaraldehyde로 고정시켰다. 고정된 시료를 0.1 M phosphate buffer 용액으로 10분 동안 2번 씻어낸 후, 연속

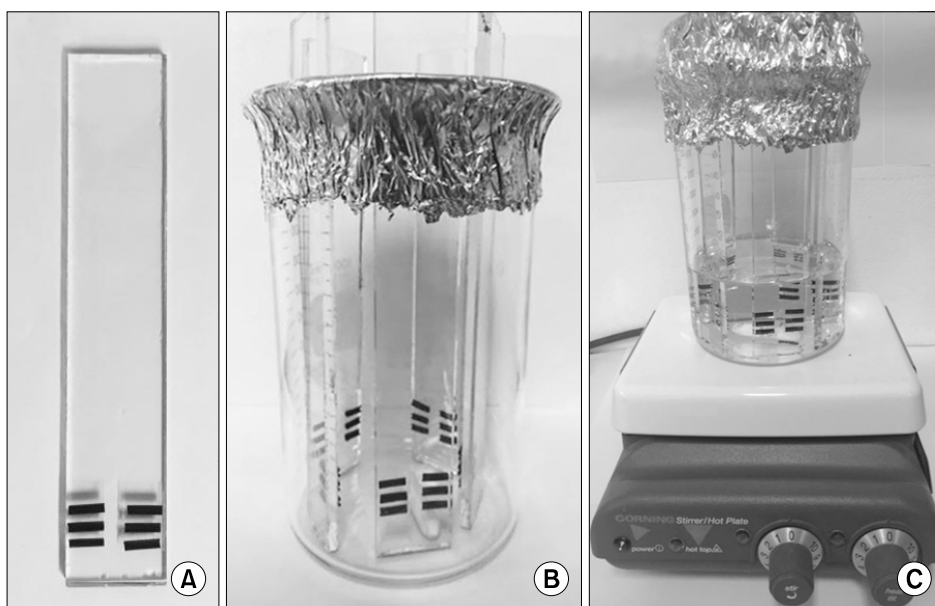


Fig. 2. Laboratory model used in our dental unit waterline biofilm formation study. (A) Glass rod with polyurethane tubing samples, (B) a beaker placed the five glass rod-sand a magnetic stir, (C) the model set on the stirrer.

적으로 높은 농도의 에탄올(30%, 50%, 70%, 90%, 100%)을 사용하여 탈수시켰다. 건조 후, 시료를 stub 위에 고정시키고, 금으로 코팅하여 SEM으로 관찰하였다.

(2) CLSM

바이오필름의 분포와 두께를 확인하기 위해 CLSM (IX71 Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 모델에서 바이오필름을 형성한 폴리우레탄 튜빙 조각을 LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)로 염색한 후 살아있는 세균과 죽은 세균을 비교 분석하였다. 3 µl의 SYTO 9 (Molecular Probes)과 3 µl의 propidium iodide를 멸균증류수 1 ml에 희석하여 염색을 위해 사용하였다. 희석한 시약 200 µl를 폴리우레탄 튜빙 조각에 적용하고 20분 동안 암실상태에서 반응시킨 후 멸균증류수로 세척하고 CLSM으로 1,000× 배율에서 관찰하였다. 여기파장 480 nm, 방출파장 500 nm에서 SYTO 9로 염색된 살아있는 세균에 해당하는 녹색을 측정하고, 여기파장 490 nm, 방출파장 635 nm에서 propidium iodide로 염색된 손상된 세균을 나타내는 붉은색을 측정하였다. CLSM 촬영 사진은 1 µm 두께 간격으로 얻었다.

5. 바이오필름 적절성 확인을 위한 소독제 적용 실험

실험실 모델에서 4일 동안 바이오필름을 형성시킨 폴리우레탄 튜빙을 수관 소독을 위해 주로 사용되는 0.5% 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite, Household Bleach; Yuhan Clorox, Incheon, Korea)과 2% 과산화수소(hydrogen peroxide; Merck, Hohenbrunn, Germany), 0.2% 클로르헥시딘(chlorhexidine; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 소독하고 그 효능을 조사하였다. 또한 각 소독제의 농도를 10:1, 10²:1로 희석한 후 소독 효과를 비교하였다. 12 well plate (SPL, Seoul, Korea)에 각각의 소독제를 넣고 바이오필름을 형성시킨 폴리우레탄 튜빙 조각을 넣어 폴리우레탄 튜빙에 소독제를 노출시켰다. 노출시간은 임상에서 DUWL에 소독제를 노출시키는 시간으로, 진료가 끝난 후부터 다음날 진료 시작할 때까지의 시간인 15시간 동안 노출시켰다. 소독제 적용 전, 후 바이오필름 내 살아있는 세균수의 비교를 위해 위의 바이오필름 축적량 분석에서 설명한 방법대로 폴리우레탄 튜빙 조각에서 바이오필름을 분리시킨 후, PBS에 현탁시킨 용액을 R2A 고체배지에 도말하고 25°C에서 7일간 배양하였다. 7일 배양 후 배지에 형성된 세균 집락을 계수하여 CFU/cm²을 계산하였다. 소독제 적용 후 바이오필름 내 살아있는 세균수의 감소율을 아래 계산식대로 계산하였다.

바이오필름 내 살아있는 세균수 감소율(%)

$$= \frac{\text{소독제 적용 전 바이오필름 내 살아있는 세균수} - \text{소독제 적용 후 바이오필름 내 살아있는 세균수}}{\text{소독제 적용 전 바이오필름 내 살아있는 세균수}} \times 100$$

결 과

1. DUWL 세균 배양

바이오필름 형성을 위한 세균 배양액을 얻기 위해 -70°C에 보관되어 있는 세균 stock을 R2A 액체배지에 접종하여 25°C에서 배양하였다. 배양 2일 후부터 대수증식기(log phase)가 시작되었다. 5일 배양한 세균액을 바이오필름 형성을 위해 사용하였다. 5일 배양한 후 평균 세균의 수는 3.43×10⁷ CFU/ml였다.

2. 바이오필름 분석

1) 바이오필름 축적량 분석

바이오필름 형성 2일 이후부터 6일까지 비슷한 바이오필름 축적량을 보여주었다(Fig. 3). 바이오필름의 성숙도를 고려하여 바이오필름 형성 기간을 4일로 정하였다. 4일 동안 배양시킨 바이오필름의 평균 축적량은 4.68×10⁴ CFU/cm²였다.

2) 모델에서 형성된 바이오필름 구성 세균 집락 비율

폴리우레탄 튜빙에서 바이오필름을 분리하여 PBS 용액

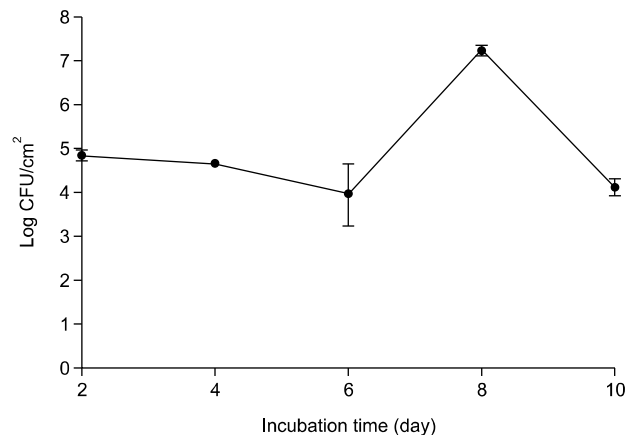


Fig. 3. Accumulation of biofilm on polyurethane tubing samples in our laboratory model. Black points represent the mean of the log colony forming unit (CFU)/cm² measured every two days during the growth period of the biofilm. The error bars indicate standard deviations of the mean.

에 현탁시킨 용액을 R2A 고체배지에 도말하고 배양한 결과 하얀색, 빨간색, 노란색을 띄는 세균의 집락이 형성되었다. 주로 하얀색의 집락이 많았으며, 빨간색 집락, 노란색 집락 순으로 많았다. 하얀색 집락, 빨간색 집락, 노란색 집락의 비율은 약 150:10:1이었다.

3) 바이오필름 형태

바이오필름을 구성하는 세균의 분포를 확인하기 위해 CLSM으로 촬영한 결과, 바이오필름을 구성하는 세균은 부분적으로 응집되어 덩어리를 이루고 있는 양상이 관찰되었다(Fig. 4). 바이오필름 두께는 위치별로 차이가 있었지만 10~14 μm 였다(Fig. 4). 4일 동안 형성시킨 바이오필름은 대부분 살아있는 세균으로 구성되어 있었다(Fig. 4).

바이오필름을 구성하는 세균의 형태를 확인하기 위해 SEM으로 촬영한 결과, 주로 짧은 길이의 간균이 관찰되었으며, 그 외 구균과 중간길이의 간균의 형태를 확인하였다(Fig. 5). 세균덩어리에서는 세균이 만든 세포 외 다당류로 추정되는 물질을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

3. 소독제 적용 및 적절성 확인

우리의 실험실 모델에서 4일 동안 바이오필름을 형성시

킨 폴리우레탄 튜빙을 다양한 농도의 소독제로 처리했을 때, 각각의 소독제 모두 기존의 권장 농도에서 가장 높은 효과를 보였다(Table 1). 0.5% 차아염소산나트륨(NaOCl), 2% 과산화수소(H_2O_2), 0.2% 클로르헥시딘에서 바이오필름을 구성하는 살아있는 세균이 100% 감소하였다. 기존의 권장 농도를 10:1, 10²:1로 희석한 소독제들 중에서 0.002% 클로르헥시딘의 효과가 가장 좋았다. 0.005% 차아염소산나트륨으로 처리한 후 바이오필름을 구성하는 살아있는 세균수를 23% 감소시켰다. 소독제의 농도가 높을수록 바이오필름을 구성하는 살아있는 세균이 감소하였고 이는 실험실 모델 바이오필름이 소독제 효과를 확인하기 위해 적절한 것으로 보인다.

고 찰

DUWL 물의 세균 오염도가 높은 원인으로 물의 온도, DUWL의 재질, DUWL의 좁은 내경, DUWL 내 물의 긴 정체시간, DUWL 내면에 부착한 바이오필름 등이 제시되고 있다^{19,25,26}. DUWL 내면에 형성한 바이오필름은 DUWL로 공급되는 세균의 근원지 역할을 하기 때문에 DUWL 소독을 위해서는 바이오필름을 제거하거나 감소시키는 방법을

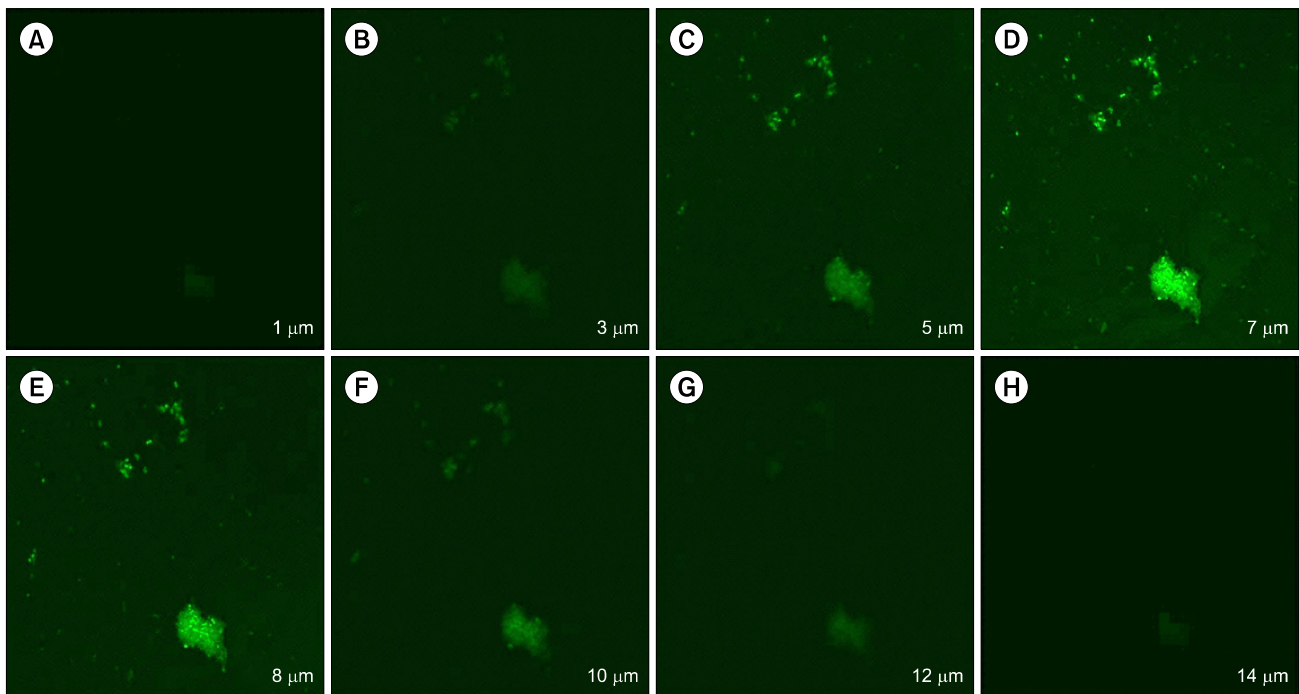


Fig. 4. (A~H) Confocal laser scanning microscope images of four days old biofilm of inner surface on polyurethane tubing samples in laboratory model. From left to right, the images were taken from the bottom layer to the top layer of the biofilm ($\times 1,000$). Live bacteria (fluorescent green) were stained with SYTO 9 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), while dead bacteria (fluorescent red) were stained by propidium iodide.

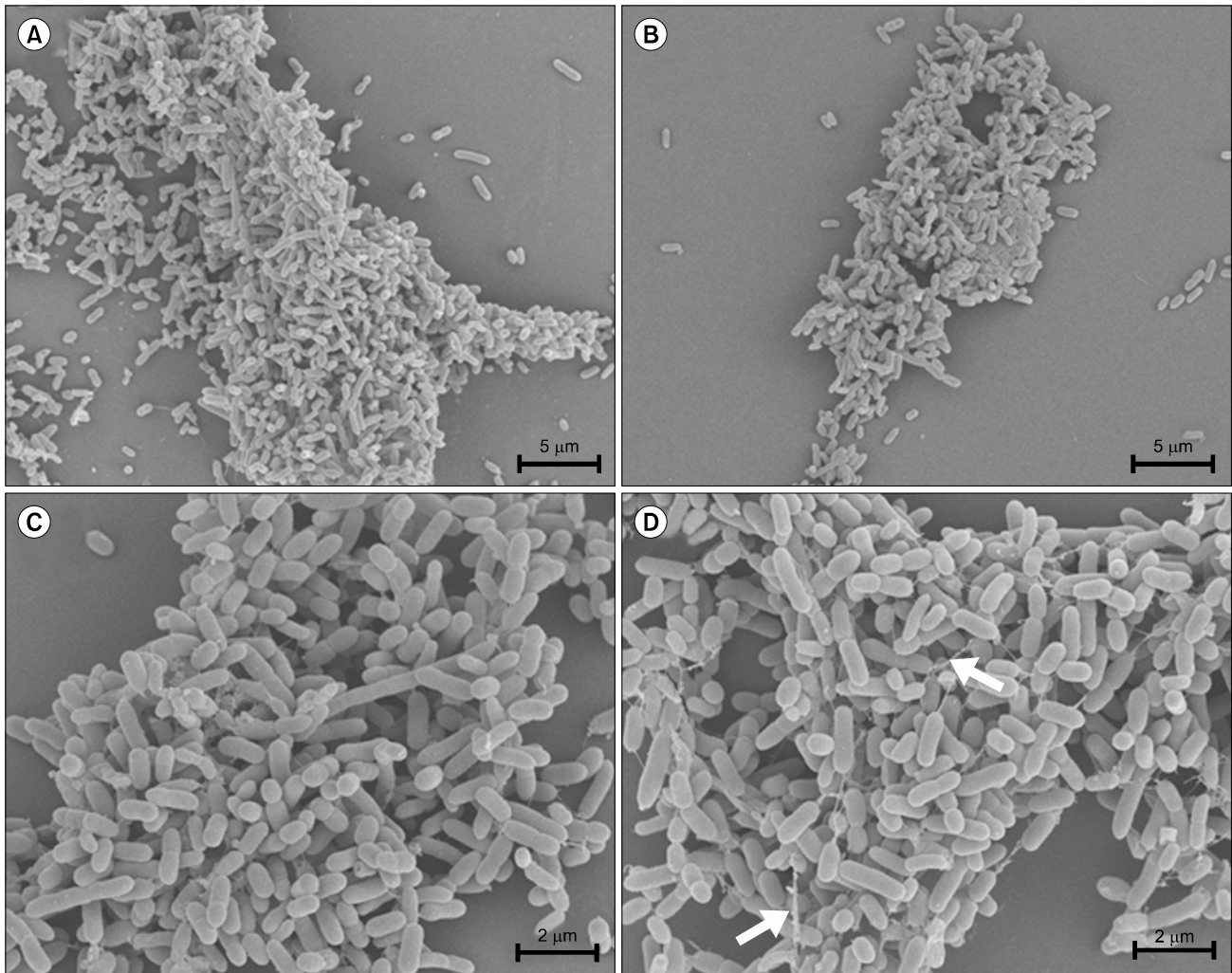


Fig. 5. Scanning electron microscope images of the four days old biofilm of inner surface on polyurethane tubing samples in laboratory model (A, B: $\times 2,000$; C, D: $\times 5,000$). Various bacterial morphotypes were observed including cocci, short and medium length rods. Extracellular polysaccharides (D, arrows) were observed.

Table 1. Percentage Reduction of Live Bacteria in Laboratory Model Biofilm after Exposure to Disinfectants

| Disinfectants | Concentration | % Reduction |
|-------------------------------|------------------|-------------|
| NaOCl | 0.5 ^a | 100±0 |
| | 0.005 | 23±1.1 |
| | 0.0005 | 18±2.7 |
| H ₂ O ₂ | 2 ^a | 100±0 |
| | 0.02 | 98±0.3 |
| | 0.002 | 34±18.9 |
| Chlorhexidine | 0.2 ^a | 100±0 |
| | 0.002 | 99±0.2 |
| | 0.0002 | 92±0.7 |

Values are presented as percentage only or mean±standard deviation.

^aConcentration recommended for waterline disinfection.

사용하는 것이 효과적이다^{16,26}. 본 연구에서는 바이오필름이 형성되어 있는 오염된 DUWL을 얻기 위해 DUWL 바이오필름 실험실 모델을 제작하였다. Walker 등¹⁷⁾은 시판되고 있는 다양한 소독제품의 효과를 비교하기 위해 DUWL 바이오필름을 실험실에서 모델을 사용하여 형성시켰다. Walker의 모델은 chemostat 안에 치과용 유닛로부터 수집한 세균을 접종시킨 후 회분배양 48시간, 연속배양(continuous culture) 7일 동안 세균을 배양시킨 후 세균 배양액을 폴리우레탄 튜빙에 14일 동안 흘려주어 최종적으로 DUWL 바이오필름을 형성하기까지 3주가 넘는 다소 긴 시간을 가진다. 이와 같이 Walker 등¹⁷⁾의 모델은 특수한 장치가 필요하고 바이오필름 형성기간이 길다는 점에서 제작에 어려움이 있다. Yabune 등²⁷⁾은 불소로 코팅한 DUWL의 세

균 부착 억제 효과를 확인하기 위해 실험실 모델을 제작하였다. Yabune 등²⁷⁾은 치과용 유니트에서 분리한 지배적인 세균 3종을 현탁한 현탁액에 폴리우레탄 튜빙을 담가 정체 상태에서 바이오필름을 형성시켰다. 이 모델은 바이오필름 형성기간이 96시간으로 짧다는 장점이 있지만 3종의 세균만을 사용하고 정체상태로 바이오필름을 형성시켰다는 점에서 한계를 가진다. 본 연구의 실험실 모델은 바이오필름 형성을 위해 총 9일의 기간이 걸렸으며, 사용중인 치과용 유니트에서 배출된 물을 여과시켜 수집한 세균을 R2A 배지에서 배양하여 바이오필름 형성을 위해 사용하였다. Walker 등¹⁷⁾의 모델과 같이 배양배지로 멸균 증류수를 사용하는 것이 실제 임상 DUWL 내 세균의 성장 환경과 더 유사하지만, 본 실험의 예비실험에서 멸균증류수를 사용하여 실험실 모델을 제작하였을 때, 바이오필름 형성 기간이 길어지는 문제가 발생했다(result do not shown). 따라서 본 연구에서는 바이오필름의 형성기간을 단축시키기 위해 R2A 배지를 선택하였다. 본 연구에서는 바이오필름 형성 시, 주기적인 배지 교체로 세균이 성장할 수 있는 영양분을 공급해 주었고 와류를 적용하여 임상의 DUWL에서 일어나는 물의 흐름과 유사한 상황을 만들어 주었다. 또한, 본 연구의 실험실 모델은 특수한 장치가 필요 없으며, 비커나 유리막대 같은 주위에서 쉽게 구할 수 있는 재료로 제작되었기 때문에 실험실에서 재현하기 쉽다는 장점을 가진다. 바이오필름의 축적량과 두께에서, Walker 등¹⁷⁾의 모델은 평균 바이오필름 축적량이 3.4×10^4 CFU/cm²였고 우리의 실험실 모델에서 측정된 평균 바이오필름 축적량은 4.68×10^4 CFU/cm²로 본 실험실 모델의 바이오필름 형성 기간이 더 짧았지만 많은 축적량을 보였다. 또한 Yabune 등²⁷⁾의 실험실 모델에서 형성시킨 바이오필름 두께는 2~5 μ m로 보고되었으나, 본 연구에서 제작한 실험실 모델에서 형성시킨 바이오필름의 두께는 10~14 μ m로 더 두꺼웠다.

Cobb 등¹⁶⁾의 연구 결과로, 미국 치과대학 병원 내에서 사용중인 DUWL 바이오필름을 구성하는 세균으로 구균, 간균, 중간 길이의 간균 그리고 나선균이 포함되어 있는 것을 확인하였으며, 또한 DUWL 바이오필름은 세균과 세포의 다당류가 함께 응집되어 이루고 있으며 바이오필름의 두께는 10~50 μ m로 다양하다고 보고하였다. Yabune 등²⁸⁾은 새로운 치과용 유니트를 일본 치과대학병원 내 설치 후 52일, 94일, 157일, 185일에 DUWL의 바이오필름 형태를 SEM으로 확인하였다. 시간이 지날수록 중간 길이의 간균과 세포의 다당류가 늘어났으며 세균과 세포의 다당류의 응집 덩어리 크기가 점점 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Yabune 등²⁷⁾의 다른 연구에서 dental chair unit으로부터 수

집한 물을 R2A 고체배지에 배양하였을 때, 노란색, 하얀색, 빨간색의 세균 집락이 나타났으며, 노란색 집락을 띤 세균은 *Sphingomonas paucimobilis*로, 하얀색은 *Acinetobacter haemolyticus*, 빨간색은 *Methylobacterium mesophilicum*인 것을 밝혔다. 그리고 배지에 노란색 집락, 하얀색 집락, 빨간색 집락의 비율이 18:1:1로 나타났으며, *S. paucimobilis*가 가장 많이 검출되는 세균 종으로 확인되었다. Cobb 등¹⁶⁾이 보고한 임상에서 사용 중인 DUWL의 바이오필름을 구성하는 구균과 간균의 형태는 본 실험에서 제작한 모델에서도 확인할 수 있었으며, 세균끼리 그리고 세균과 세균이 생성한 세포외 다당류가 응집되어 있는 양상 또한 확인할 수 있었다. 바이오필름의 두께도 10~14 μ m로 임상의 DUWL 바이오필름 두께 범위(10~50 μ m) 안에 포함되었다. 본 실험에서 제작한 실험실 모델에서 검출되는 세균 집락의 비율로는 노란색, 하얀색, 빨간색이 1:150:10이었으며, 하얀색의 세균 집락이 가장 많이 나타나는 점은 Yabune 등²⁷⁾의 연구 결과와 차이를 보였다. 차이의 원인은 국가별로 상수에 포함된 화학물질들의 농도가 다르기 때문으로 추측된다. 국내에서 사용 중인 DUWL에서 배출된 물을 R2A 고체 배지에 접종시켜 배양한 후 검출되는 세균 집락의 비율을 확인하였을 때, 노란색, 하얀색, 빨간색이 1:100:10으로 본 실험에서 제작한 실험실 모델에서 검출되는 세균 집락의 비율과 유사하였다(result do not shown). 따라서 본 연구에서 제작한 실험실 모델의 바이오필름은 구성 세균의 비율, 다양성 및 형성된 바이오필름의 두께에 있어서 임상의 DUWL 내 바이오필름과 높은 유사성을 가지는 것으로 확인되었다.

본 연구의 실험실 모델로 형성시킨 DUWL 바이오필름이 소독제의 효과를 확인하기 위한 시료로서 적절한지 파악하기 위해 각 소독제의 농도를 다르게 하여 적용시켰을 때, 소독제의 농도가 낮아질수록 바이오필름을 구성하는 살아있는 세균의 감소율이 낮아졌다. Walker 등¹⁷⁾의 실험실 모델에서 다양한 소독제품의 효과들을 비교하였을 때, 주로 과산화수소 또는 차아염소산 나트륨을 포함한 제품들이 바이오필름 감소와 제거에 효과적이었다. Walker 등⁶⁾의 연구에 사용한 소독제품의 일부를 임상의 치과용 유니트에서 소독 효과를 확인한 결과, 과산화수소를 함유한 제품이 가장 효과적이었다. 이러한 결과를 통해 본 연구의 실험실 모델을 비롯하여 모델을 대상으로 소독제의 효과를 비교하거나 새로운 소독제의 효과를 확인하는 것은 적절하다고 판단된다.

현재까지 사용되고 있는 다양한 소독제들 중 차아염소산 나트륨 함유 소독제와 과산화수소 함유 소독제가 효과적이라고 밝혀졌지만, 차아염소산나트륨은 치과용 유니트의 금속부품을 부식시키고 트리할로메탄과 같은 발암물질을 생

성하는 등의 부작용이 보고되었고^{20,24)}, 과산화수소는 금속 부품의 부식과 수관의 막힘 등의 부작용이 있다고 보고되어 소독제의 계속적 적용이 제한되고 있다^{23,25)}. 따라서 DUWL 바이오필름을 감소 및 제거하는 효능이 뛰어나면서 부작용이 없는 새로운 소독제가 개발될 필요가 있으며, 새로운 소독제를 개발하는 과정에 본 실험에서 확립된 실험실 모델이 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예상된다. 또한 소독제의 효과 확인 외에 항균 물질로 처리된 수관의 바이오필름 형성 억제 효과를 확인하기 위해 본 실험에서 확립된 실험실 모델이 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 실험실에서 DUWL 바이오필름을 형성시킬 수 있는 제작이 간편한 실험실 모델을 제시하며, 이 실험실 모델은 향후 다양한 목적의 실험에서 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

DUWL에 형성된 바이오필름 제거를 위한 효과적인 소독제의 제시와 새로운 소독제의 개발을 위해 DUWL의 실험실 모델의 확립이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 실험실에서 쉽게 구할 수 있는 장비들로 실험실 모델을 제작하여, DUWL 바이오필름을 재현하기 위한 새로운 실험실 모델을 확립하고자 하였다. 사용 중인 DUWL을 통해 수집한 물에서 세균을 모은 후, R2A 액체 배지에서 10일 동안 배양시켰다. 10일 배양시킨 세균액을 -70°C 에 보관하여 사용하였다. -70°C 에 저장한 세균 stock은 R2A 액체배지에 5일 동안 회분 배양시킨 배양액은 모델에서 바이오필름을 형성시키기 위해 사용되었다. 바이오필름 형성 모델은 실험실 내 장비인 1 L 비커에 폴리우레탄 튜빙이 부착된 20 cm 유리막대를 꽂아서 제작하였다. 모델을 멸균시킨 후 R2A 액체배지 300 ml와 5일 동안 회분 배양한 세균액 50 ml을 넣고 stir plate에서 25°C 로 배양시켰다. 배양 2일마다 R2A 액체배지를 교체해주었다. 임상 상황과 유사한 조건에서 바이오필름을 형성하기 위해 와류상태는 오전 9시부터 오후 6시까지 적용시키고 그 이외의 시간에는(약 15시간) 정체상태로 배양시켰다. 바이오필름 형성은 4일 동안 진행하였으며, 그 후 바이오필름의 두께, 바이오필름을 구성하는 세균의 분포 및 형태학적 특징을 SEM과 CLSM을 사용하여 분석하였다. 4일 바이오필름 형성 후 평균 바이오필름 축적량은 4.68×10^4 CFU/cm²였고, 바이오필름의 두께는 10~14 μm 였다. 또한 바이오필름을 구성하는 세균들이 부분적으로 응집되어 덩어리를 이루고 있는 양상을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 제작한 실험실 모델을 대상으로 차아염소산나트륨, 과산화수소 그리고 클로르헥시딘과 같은 소독제의 효과를 확인하

였다. 그 결과 적용된 소독제의 농도가 낮을수록 바이오필름 내 생존한 세균의 수가 많았다. 따라서 우리의 실험실 모델에서 형성시킨 바이오필름은 소독제의 효과를 비교하기 위해 적절한 것으로 판단된다. 우리의 실험실 모델은 향후 DUWL 소독을 위한 새로운 방법의 개발을 위해 유용하게 사용될 것으로 예상된다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초 연구 사업임(No. 2015R1D1A1A01057790).

References

- Williams JF, Johnston AM, Johnson B, Huntington MK, Mackenzie CD: Microbial contamination of dental unit waterlines: prevalence, intensity and microbiological characteristics. *J Am Dent Assoc* 124: 59-65, 1993.
- Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, et al.: Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. *Appl Environ Microbiol* 62: 3954-3959, 1996.
- Lee BM, Kim CW, Kim YS: A study on the microbial contamination of dental unit and ultrasonic scaler. *J Korean Acad Prosthodont* 36: 64-80, 1998.
- Meiller TF, Depaola LG, Kelley JI, Baqui AA, Turng BF, Falkler WA: Dental unit waterlines: biofilms, disinfection and recurrence. *J Am Dent Assoc* 130: 65-72, 1999.
- Walker JT, Bradshaw DJ, Bennett AM, Fulford MR, Martin MV, Marsh PD: Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl Environ Microbiol* 66: 3363-3367, 2000.
- Walker JT, Bradshaw DJ, Finney M, et al.: Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in Europe. *Eur J Oral Sci* 112: 412-418, 2004.
- Yoon HY, Lee SY: Bacterial contamination of dental unit water systems in a student clinical simulation laboratory of college of dentistry. *J Dent Hyg Sci* 2: 232-237, 2015.
- Williams HN, Paszko-Kolva C, Shahamat M, Palmer C, Pettis C, Kelley J: Molecular techniques reveal high prevalence of legionella in dental units. *J Am Dent Assoc* 127: 1188-1193, 1996.
- Singh R, Stine OC, Smith DL, Spitznagel JK Jr, Labib ME,

- Williams HN: Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Appl Environ Microbiol* 69: 3412-3420, 2003.
10. Porteous NB, Redding SW, Jorgensen JH: Isolation of non-tuberculosis mycobacteria in treated dental unit waterlines. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98: 40-44, 2004.
 11. Dutil S, Veillette M, Meriaux A, Lazure L, Barbeau J, Duchaine C: Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environ Microbiol* 9: 2836-2843, 2007.
 12. Al-Hiyasat AS, Ma'ayeh SY, Hindiyyeh MY, Khader YS: The presence of *Pseudomonas aeruginosa* in the dental unit waterline systems of teaching clinics. *Int J Dent Hyg* 5: 36-44, 2007.
 13. Kohn WG, Harte JA, Malvitz DM, et al.: Guidelines for infection control in dental health care settings-2003. *J Am Dent Assoc* 135: 33-47, 2004.
 14. American Dental Association Council on Scientific Affairs. Dental unit waterlines: approaching the year 2000. *J Am Dent Assoc* 130: 1653-1664, 1999.
 15. Fiehn NE, Larsen T: The effect of drying dental unit waterline biofilms on the bacterial load of dental unit water. *Int Dent J* 52: 251-254, 2002.
 16. Cobb CM, Martel CR, McKnight SA 3rd, Pasley-Mowry C, Ferguson BL, Williams K: How does time-dependent dental unit waterline flushing affect planktonic bacteria levels? *J Dent Educ* 66: 549-555, 2002.
 17. Walker JT, Bradshaw DJ, Fulford MR, Marsh PD: Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol* 69: 3327-3332, 2003.
 18. Copenhagen TL: The effect of ultrafiltration on the quality of water from dental units. *Int Dent J* 56: 352-355, 2006.
 19. Walker JT, Marsh PD: Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants. *J Dent* 35: 721-730, 2007.
 20. Karpay RI, Plamondon TJ, Mills SE, Dove SB: Combining periodic and continuous sodium hypochlorite treatment to control biofilms in dental unit water systems. *J Am Dent Assoc* 130: 957-965, 1999.
 21. Smith AJ, Bagg J, Hood J: Use of chlorine dioxide to disinfect dental unit waterlines. *J Hosp Infect* 49: 285-288, 2001.
 22. Kettering JD, Munoz-Viveros CA, Stephens JA, Naylor WP, Zhang W: Reducing bacterial counts in dental unit waterlines: distilled water vs. antimicrobial agents. *J Calif Dent Assoc* 30: 735-741, 2002.
 23. Schel AJ, Marsh PD, Bradshaw DJ, et al.: Comparison of the efficacies of disinfectants to control microbial contamination in dental unit water systems in general dental practices across the European union. *Appl Environ Microbiol* 72: 1380-1387, 2006.
 24. Lin SM, Svoboda KK, Giletto A, Seibert J, Puttaiah R: Effects of hydrogen peroxide on dental unit biofilms and treatment water contamination. *Eur J Dent* 5: 47-59, 2011.
 25. O'Donnell MJ, Boyle MA, Russell RJ, Coleman DC: Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century. *Future Microbiol* 6: 1209-1226, 2011.
 26. Williams HN, Baer ML, Kelley JJ: Contribution of biofilm bacteria to the contamination of the dental unit water supply. *J Am Dent Assoc* 126: 1255-1260, 1995.
 27. Yabune T, Imazato S, Ebisu S: Assessment of inhibitory effects of fluoride-coated tubes on biofilm formation by using the in vitro dental unit waterline biofilm model. *Appl Environ Microbiol* 74: 5958-5964, 2008.
 28. Yabune T, Imazato S, Ebisu S: Inhibitory effect of PVDF tubes on biofilm formation in dental unit waterlines. *Dent Mater* 21: 780-786, 2005.