

원저

대한구강보건학회지 : 제 30권 제 3호, 2006
J Korean Acad Dent Health Vol. 30, No. 3, 2006

Streptococcus mutans의 선택성 향상을 위한 방법 고찰: 원심분리법과 선택 배지의 활용

김민영, 권호근, 김백일

연세대학교 치과대학 예방치과학교실, 구강과학연구소, 구강악안면경조직재생센터

색인: 선택배양, 원심분리, MSB, MS-MUT, Streptococcus mutans

1. 서 론

치아우식증의 중요 원인균주로서 Streptococcus mutans(S. mutans)가 밝혀진 이래로 이와 관련된 많은 연구가 진행되어 왔다¹⁻⁴⁾. 특히 사람의 타액으로부터 S. mutans를 선택적으로 분리하기 위한 여러 가지 시도들이 있었는데^{5,6)} 그중에 Mitis salivarius agar에 bacitracin을 첨가한 MSB(mitis salivarius-sucrose-bacitracin) 배지가 가장 일반적으로 사용되고 있다⁷⁾. 그러나 대표적인 S. mutans 선택배지로 알려진 MSB 배지를 이용한다 하더라도 S. mutans 이외의 다른 균주가 많이 출현함에 따라 MSB 배지의 선택 배양 결과 해석에 대해서도 이견이 있으며, MSB 배지보다 선택성이 향상된 배지를 개발하기 위한 여러 연구들이 진행되고 있다⁸⁻¹¹⁾. 구체적으로 TYCSB(Trypticase-yeast extract-cystine-sucrose-bacitracin)⁹⁾, GSTB(Glucose-sucrose-potassium tellurite-bacitracin)¹⁰⁾, MSKB(mitis salivarius-

sorbitol-kanamycin sulfate-bacitracin)¹¹⁾ 등의 배지들이 기존의 MSB 배지에 비해서 S. mutans의 선택 배양에 보다 유리하다는 보고가 있었고, 최근에는 Hirasawa와 Takada¹²⁾가 MSB에서 한 단계 더 선택성을 높인 MS-MUT를 개발하였다고 보고하였다. Hirasawa와 Takada는 MS-MUT 배지에서 새롭게 추가한 항균성분인 sulfisoxazole이 기존의 MSB 배지에서는 제거할 수 없었던 Streptococcus sobrinus의 증식을 효율적으로 억제시켜서 선택성을 향상시킬 수 있다고 주장하였다. 그러나 위와 같은 선택 연구들은 배지성분 중에서 일부를 변화시킴으로써 선택성을 향상시키려는 노력들이 대부분이었기 때문에 제한점이 있었고, 이로 인해 선택성 향상을 위해 배지성분이 아닌 다른 요인에 대한 연구의 필요성이 제기되었다. 이에 본 연구에서는 원심 분리과정이 S. mutans의 선택성을 향상시킬 수 있다는 가능성에 주목하게 되었다.

원심분리는 회전할 때 발생하는 원심력을 이용하

여 혼합물 내 밀도 및 크기가 상이한 물질을 서로 분리하는 것이다. 즉, 혼합물 내의 입자가 원심분리기 속에서 받는 원심력이 액체 속에서 받는 부력과 마찰력의 합이 동일해지는 지점에서 위치가 고정됨을 의미한다. 혼합물을 원심 분리해보면, 고체 입자임에도 하층에 침전되지 않고 중간이나 상층부에 분리가 되는 현상은 이에 기인 한다¹³⁾. 본 연구의 가설은 이러한 현상을 기초로 하여 원심분리과정에서 발생하는 원심력이 *S. mutans* 배양의 선택성을 향상시키는데 이용될 수 있다는 것이다. 즉, 타액에서 배양된 각종 균주들은 해부학적 형태가 다르기 때문에 원심분리를 하였을 때 균주가 받는 원심력의 크기가 각기 다를 것이다. *S. mutans*의 경우, 균주의 형태는 구형이고 평균 직경이 0.3 μm 로써 다른 균들에 비해서 상대적으로 크기가 작다¹⁴⁾. 반면에 *S. mutans* 이외에 구강 내에 치아우식증 발생과 관련된 균주인 *Lactobacillus* spp.¹⁵⁾와 같은 균주들은 간균 형태이며 그 크기가 0.5-1.5 μm 정도로써 상대적으로 크기가 크기 때문에¹⁶⁾ 원심분리를 시행했을 때 *S. mutans* 보다 더 큰 원심력을 받을 것으로 사료된다. 즉, 구강 내 균주의 형태학적 차이로 인해 원심분리시 각각의 균주가 받는 원심력에 차이가 발생하여 *S. mutans*를 제외한 다른 균주들이 상대적으로 큰 원심력으로 인해 파괴될 가능성이 높아진다. 이러한 현상을 활용한다면 타액 내 미생물간의 밀도와 원심분리시 받는 원심력의 차이로 인해서 *S. mutans*의 선택능력을 향상시킬 수 있을 것이다¹⁷⁾. 즉, 원심분리 과정을 통해서 1차로 선별된 미생물들을 대상으로 전용 선택 배지를 이용하여 배양한다면 *S. mutans*의 선택성을 좀 더 향상시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

본 연구의 목적은 첫째로, 기존의 *S. mutans* 선택배지인 MSB 배지와 가장 최근에 개발된 선택배지인 MS-MUT 배지간의 선택능력을 비교하고자 하였으며, 둘째, *S. mutans* 선택배양시 다양한 속도의 원심

력을 적용시킴으로써 원심분리과정이 *S. mutans* 선택배지의 선택성을 향상시킬 수 있는지를 규명하고자 하였다.

2. 연구재료 및 방법

2.1. 타액표본 채취

본 연구에 참여한 피검자들은 전신질환이 없으며, 구강 내에 현재 진행 중인 치아우식증과 치주질환이 없는 건강한 성인 남녀 25명(남자 13명, 여자 12명)을 대상으로 하였다. 피검자들의 연령은 20-30세였으며, 모든 피검자들로부터 타액 채취 전에 동의서를 받고서 진행하였다. 피검자들을 대상으로 5분 동안 paraffin wax를 씹어 자극성 타액을 채취하였고 이를 생물학적인 분석이전에 10% glycerol을 첨가하여 -70°C에서 급속 냉동시켜 보관하였다^{18,20)}.

2.2. *S. mutans* 선택배지

본 연구에서 타액 내 *S. mutans*를 선택적으로 배양하기 위한 선택배지로써 MSB와 MS-MUT를 사용하였다. MSB 배지는 기존에 *S. mutans*를 선택 배양하기 위해 널리 사용해왔던 배지이고, MS-MUT 배지는 기존의 MSB 배지의 *S. mutans* 선별성을 높이기 위해서 Hirasawa와 Takada¹²⁾가 개발한 새로운 선택배지이다.

MSB 배지는 다음과 같은 방법에 의해서 제조하였다. 먼저 3차 증류수 1,000 ml에 90 g mitis salivarius agar(Difco, USA)와 자당(Wako Pure Chemical Co, Tokyo, Japan) 150 g을 넣고 멸균시킨 다음 50°C로 식힌 후에 0.1 g tellulite(Sigma Chemical Co, USA)와 300 units의 bacitracin(Sigma Chemical Co, USA)을 첨가하였다. 이를 멸균된 페트리디쉬에 적정량을 부어 굳힌 후 1일간 냉장 보관하여 사용하였다.

한편, 새로운 성분의 배지인 MS-MUT 배지는 3차 증류수 1,000 ml에 90 g mitis salivarius agar, 150 g

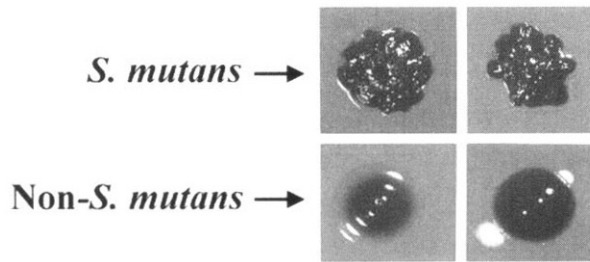


Fig. 1. Morphological differences in colonies of *S. mutans* and non-*S. mutans* ($\times 10$)

자당을 넣고 멸균시킨 다음 50℃로 식힌 후에 0.2 g의 sulfisoxazole(Wako Pure Chemical Co, Tokyo, Japan)과 300 units의 bacitracin(Sigma Chemical Co, USA)을 첨가하여 제조하였다.

2.3. 원심분리 방법

원심력의 크기는 질량 \times 반지름 \times 각속도의 제곱으로 계산할 수 있는데, 일정 회전수 이상이 되면 배지에 의한 부력이 증가하여 오히려 하층에 가라앉은 입자가 상층부로 퍼져나갈 수 있다. 그러므로 *S. mutans*의 선택성을 향상시키기 위한 최적화된 속도를 알아내기 위해서 상대 원심력(relative centrifugal force, $\times g$)에 따라 구분하였다. 본 실험에서 사용한 원심분리 속도는 각각 1,000, 5,000, 13,000, 20,000 $\times g$ 의 4단계로 나누었으며, 모든 원심분리는 4℃에서 15분간 진행하였다.

2.4. 배양 방법

원심분리를 시행하지 않은 자극성 타액 표본과 4단계의 속도(1,000, 5,000, 13,000, 20,000 $\times g$)로 원심분리를 해서 분리된 자극성 타액 표본의 상층액과 하층액을 각각 채취하였다. 이를 멸균된 0.05 M 인산칼륨원충용액(pH 7.3)을 이용하여 1,000배로 희석하였다. 희석된 타액표본 100 μ l를 MSB와 MS-MUT 선택배지에 분주하여 도달한 뒤 수소 5%, 이산화탄소 10%, 질소 85% 조건의 37℃ 혐기성 배양

기에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 MSB, MS-MUT 배지에서 자란 미생물 집락을 1명의 검사자에 의해서 해부학적 형태를 기준으로 *S. mutans*와 *S. mutans* 이외의 균주(non-*S. mutans*)로 분류해서 집락수를 측정하였다. *S. mutans*의 집락은 거칠고 울퉁불퉁한 형태였으며, *S. mutans*를 제외한 나머지 균주들의 집락은 둥글고 매끈한 형태로 이들은 모두 해부현미경을 통해 관찰하고 각각의 CFU(Colony Forming Unit)를 측정하였다(Fig. 1). 미생물 집락의 해부학적 특성을 이용한 분류의 정확성을 확인하기 위해서 분류된 미생물 집락 중 일부를 gene sequencing을 통한 정밀분석을 시행한 결과 모두 정확히 분류되고 있는 것으로 확인되었다.

2.5. 통계분석

원심분리 시행 전의 MSB와 MS-MUT 선택배지에 배양된 *S. mutans*와 non-*S. mutans*의 CFU간 차이를 t-검정을 이용하여 비교하였다. 원심분리 속도가 CFU 수에 미치는 영향은 일요인분산분석법을 이용하여 비교하였으며, 사후 검정으로 Tukey의 방법을 이용하였다. 또한 원심분리를 시행한 후 MSB와 MS-MUT 배지간의 차이는 t-검정을 통해 분석하였다. 모든 통계분석은 SPSS 12.0 for Windows 통계프로그램을 이용하였다.

Table 1. CFU values of *S. mutans* and non-*S. mutans* in non-centrifugal salivary samples ($\times 10^3$ CFU/ml)

Type	N	MSB		MS-MUT		P-value*
		Mean	SD	Mean	SD	
SM	25	290.2	325.3	229.1	210.5	0.435
n-SM	25	16.4	16.9	68.7	44.7	< 0.001

SM: *S. mutans*, n-SM: non-*S. mutans** t-test between MSB and MS-MUT media at $\alpha = 0.05$ Table 2. CFU values of *S. mutans* and non-*S. mutans* in centrifugal upper salivary samples ($\times 10^3$ CFU/ml)

Type	N	Centrifugal force(\times g)	MSB media		MS-MUT media	
			Mean	SD	Mean	SD
SM	25	1,000	0.08	0.09	3.4	3.1
		5,000	0.3	0.4	0.9	1.1
		13,000	0.1	0.2	0.4	0.8
		20,000	0.2	0.3	0.8	1.7
n-SM	25	1,000	0.03	0.06	1.7	2.3
		5,000	0.01	0.03	0.4	0.8
		13,000	0	0	0.3	0.5
		20,000	0.01	0.03	0.1	0.2

SM: *S. mutans*, n-SM: non-*S. mutans*

3. 연구성적

3.1. 원심분리 시행 전 타액 표본에 대한 MSB와 MS-MUT 배지의 선택 능력 비교

MSB와 MS-MUT 선택 배지 간에 원심분리 시행 전의 타액 표본에 대한 *S. mutans*의 선택 능력을 비교하기 위하여 25명의 피검자의 타액을 원심분리하지 않은 상태에서 상기 배지에 도말한 뒤 배양하였다. 배양 결과 *S. mutans*의 CFU 수는 MS-MUT 배지보다 MSB 배지에서 6×10^4 정도 더 많이 측정되었지만 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P=0.435$, Table 1). 반면에, non-*S. mutans*의 CFU는 MSB 배지보다 MS-MUT 배지에서 3배 이상 높은 값을 나타내어 기존에 사용하던 MSB 배지가 새롭게 개발된 MS-MUT보다 *S. mutans*를 선별해 내는데 유리함을 알 수 있었다($P < 0.001$)(Table 1). 양 배지의 선택능력을 *S. mutans*와 non-*S. mutans*의 백분율을 통해서 비교한 결과에서도 MS-MUT 배지보다는 MSB 배

지가 선택능력이 더 높은 것으로 나타났다.

3.2. 원심분리에 의한 MSB와 MS-MUT 배지의 선택 능력 차이 비교

S. mutans 선택 배양에 대한 원심분리의 효과를 알아보기 위하여 원심분리 후 MSB, MS-MUT 배지에서 배양된 *S. mutans*와 non-*S. mutans*의 CFU 수를 측정하였다. 정확한 비교를 위해서 원심분리하지 않았던 선행실험과 모든 과정을 동일하게 진행하였다. 25명의 피검자로부터 채취한 타액을 1,000, 5,000, 13,000, 20,000 \times g의 4단계로 구분하여 원심분리를 시행하였고, 원심분리 후 상층부와 하층부로 나누어진 타액 표본을 각각 배지에 도말하여 배양한 CFU 결과를 얻었다(Table 2, 3).

이 결과를 상층부와 하층부로 나누어 구분하였을 경우, 상층부 타액 표본에서는 MSB, MS-MUT 배지에 상관없이 원심분리기의 회전속도와 *S. mutans*의 관련성을 찾아볼 수 없었다. 또한, 원심분리를 하지

Table 3. CFU values of *S. mutans* and non-*S. mutans* in centrifugal lower salivary samples ($\times 10^3$ CFU/ml)

Type	N	Centrifugal force(\times g)	MSB media		MS-MUT media		P-value*
			Mean	SD	Mean	SD	
SM	25	1,000	5.3 ^a	5.1	66.7 ^a	32.1	< 0.001
		5,000	64.6 ^b	48.0	70.6 ^a	36.1	0.618
		13,000	147.9 ^c	105.0	144.0 ^b	90.8	0.888
		20,000	68.4 ^b	64.4	56.1 ^a	50.8	0.455
n-SM	25	1,000	0.03 ^a	0.05	65.5 ^a	34.1	< 0.001
		5,000	9.4 ^b	9.4	14.8 ^b	18.2	0.192
		13,000	2.3 ^a	3.6	6.5 ^b	8.4	0.024
		20,000	0.2 ^a	0.3	1.4 ^b	2.3	0.011

SM: *S. mutans*, n-SM: non-*S. mutans*

^{a,b,c} The same letter indicates no significant difference at $\alpha = 0.05$ by Tukey's studentized range test

* t-test between MSB and MS-MUT media at $\alpha = 0.05$

Table 4. Proportion of *S. mutans* in non-centrifugal and centrifugal lower salivary samples on 13,000 \times g

Media	Non-centrifugal		Centrifugal(lower)	
	SM	n-SM	SM	n-SM
MSB	95%	5%	98%	2%
MS-MUT	77%	23%	96%	4%

SM: *S. mutans*, n-SM: non-*S. mutans*

않은 타액에서 채취하여 배양된 총 CFU의 수에 비하여 원심분리 상층부의 타액에서는 매우 작은 CFU 값을 나타내었다(Table 2).

상층부 타액과는 달리 하층부 타액에서는 원심분리의 회전속도와 *S. mutans*의 CFU 간에 상관성이 존재하였다. 원심분리 후 하층부 타액에서는 큰 원심력이 작용될수록 non-*S. mutans*의 값은 감소하는 반면, *S. mutans*의 값은 13,000 \times g까지 회전속도에 비례하여 CFU가 증가하는 경향을 보였다(Table 3). 13,000 \times g의 원심력이 가해졌을 경우에 가장 높은 *S. mutans* CFU가 측정되었고, 이러한 경향은 MSB, MS-MUT 배지 모두에서 동일하게 나타났다.

원심분리과정이 *S. mutans* 선별 배양에 미치는 영향을 알아보기 위하여 원심분리를 하지 않은 상태의 *S. mutans*, non-*S. mutans* 값과 비교해 보았다. 원심분리 후 가장 많은 *S. mutans* CFU가 측정된 13,000 \times g 실험군과 원심분리를 하지 않은 실험군들을 비교하였고, 배양된 모든 미생물 중에서 *S.*

*mutans*의 백분율을 통해서 확인하였다(Table 4). 그 결과, MSB배지의 경우 13,000 \times g의 원심분리 후 하층액에서 배양한 *S. mutans*의 비율이 원심분리를 시행하지 않는 군보다 약 3% 더 높았다. 더욱이 이러한 차이는 MS-MUT 배지에서 더욱 크게 나타나서 13,000 \times g의 원심분리 시행군이 비시행군에 비해서 19%나 더 많은 *S. mutans*의 CFU를 확인할 수 있었다.

4. 고 안

치아우식증은 미생물요인, 숙주요인, 환경요인과 같은 여러 가지 요인들에 의해서 유발되는 다요인성 질환으로써 이 중에서 미생물요인의 주축을 이루고 있는 균주가 바로 *S. mutans*이다. 이러한 이유로 인해 사람의 타액이나 치태 중에서 *S. mutans*를 선별 배양하려는 많은 연구들이 시행되어 왔다. 최근까지 *S. mutans*를 선별 배양하기 위해 여러 가지 종류의

선택 배지가 개발되었지만 그 효과에 대해서는 논란의 여지가 있었다. 본 연구는 *S. mutans* 선택 배양 조건에 있어서 기존의 MSB 배지와 새롭게 개발된 MS-MUT 배지 간에 선택 능력의 차이와 원심분리라는 과정이 이들 배지들의 선택성 향상에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. 본 연구결과 *S. mutans* 선택 배양에 있어서 원심분리의 과정이 효과적인 역할을 하였고, 새롭게 개발된 MS-MUT 배지보다는 기존의 MSB 배지가 더 유리하다는 것을 확인할 수 있었다.

원심력은 회전 속도에 비례하여 증가하고 시험관 속의 압력은 이 원심력과 비례하여 상승하게 된다. 특히 원심분리를 할 때, 통상적으로 걸리는 힘이 $6,000 \times g$ 이상이므로 일반 대기압의 6,000배 이상에 해당하는 압력이 원심분리를 하고 있는 시험관 내부의 액체 속에서 발생하게 된다. 이러한 압력 조건에서 고압의 효과가 미생물의 형태학적 특징에 따라 서로 다르게 나타날 수 있기 때문에 이를 활용한다면 *S. mutans* 계열의 균주들을 보다 효과적으로 분리할 수 있다는 것이 본 연구의 가설이었다.

우선 원심분리를 하지 않는 타액을 서로 다른 배지에 배양한 결과, 전체적으로 MS-MUT 배지와 MSB 배지의 *S. mutans*의 CFU 값은 큰 차이가 없었다. 그러나 MSB 배지에서 non-*S. mutans* 값이 MS-MUT 배지보다 통계적으로 유의한 수준으로 낮았기 때문에 MSB 배지가 *S. mutans* 선택 배양에 있어서 보다 유리하다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Hirasawa와 Takada¹²⁾ 등이 제시한 선행 연구결과와는 큰 차이가 있는 것이다. 이와 같은 차이의 원인으로써 먼저 종족이나 국가 및 질병 상태에 따른 구강내 미생물 분포의 차이점을 지적할 수 있다. Beighton 등²¹⁾에 의하면 치아우식증과 관련이 있는 미생물군의 분포는 종족이나 국가별로 상당한 차이를 보이고 있다고 보고하였다. 즉, Hirasawa와 Takada¹²⁾ 등이 연구대상으로 했던 일본인과 본 연구

의 대상이었던 한국인의 구강내 미생물의 분포 자체에 차이가 존재할 가능성도 추론할 수 있다. 또한 Hirasawa와 Takada¹²⁾ 등의 연구대상자들은 건강한 사람뿐만 아니라 치아우식증이 있는 집단까지도 포함시켜서 연구대상으로 하였지만, 본 연구에서는 현재 활동성 치아우식증이 없는 건강한 피검자를 대상으로 하였기 때문에 이러한 피검자들의 구강내 환경의 차이에 의해서 두 연구결과와의 차이를 유발하였을 수도 있다. 최근에 개발된 MS-MUT 배지는 sulfisoxazole을 첨가함으로써 특히 *S. sobrinus*의 증식을 효과적으로 억제함으로써 선택성을 향상한다고 주장하고 있으나, 실제로 타액에서 배양된 non-*S. mutans* 미생물 중에서 *S. sobrinus*가 차지하는 비율은 인종이나 국가 및 피검자 구강상태에 따라서 차이가 클 수 있기 때문에 이러한 차이가 선행 연구 결과와의 차이를 유발할 수 있었을 것으로 사료되었다.

본 연구에서 나타난 두 가지 종류의 배지간의 배양 결과의 차이는 원심분리 이전의 타액 표본뿐만 아니라 원심분리 후 타액 표본을 배양한 결과에서도 동일하게 나타났다. 즉, 4단계 속도의 원심력으로 분리한 타액의 하층부에서 배양된 전체 미생물 중 *S. mutans*가 차지하는 비율은 MS-MUT보다는 MSB 배지에서 더 높게 나타났다.

본 실험에서 측정된 자료들을 비교해 보면 원심분리라는 과정을 통해서 *S. mutans*가 구강 내 다른 균주들 보다 고압의 상황에서 생존율이 더욱 높음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 원심력이 증가함에 따라 MSB, MS-MUT 배지에서 *S. mutans*의 값이 높아지는 반면에 non-*S. mutans*의 값이 확연히 줄어드는 것을 통하여 확인할 수 있었다. 이러한 현상의 원인으로써 두 가지 정도를 추론할 수 있는데, 첫째로 *S. mutans*와 non-*S. mutans*의 형태학적 특성의 차이를 고려할 수 있다. 비교적 큰 막대(rod) 형태의 non-*S. mutans*에 비해서 *S. mutans*는 크기가

작고 구형의 구조를 가지고 있기 때문에 원심분리 과정에서 원심력에 견디면서 생존할 가능성이 높다. 왜냐하면 구형의 *S. mutans*는 형태학적으로 대칭성을 갖기 때문에 표면에 미치는 원심력의 효과가 균일하게 작용하여 원심력이 균체에 미치는 파괴적인 영향력이 상대적으로 작다고 할 수 있다. 반면에 non-*S. mutans*는 간균이나 나선형 균처럼 형태학적으로 불규칙한 부분이 있기 때문에 각 면에서 받는 힘에 차이가 생길 것이며, 이런 힘의 불균형은 균체에 구부림, 비틀림, 전단 응력과 같은 기계적 힘을 유발시킬 것이고, 이런 힘을 받은 균체는 원심분리를 통해서 파괴될 가능성이 높아질 것이다. 이런 이유로 원심분리과정에서 고압에 유리한 형태를 가지고 있는 *S. mutans* 계열의 균체들이 다른 형태의 균체들보다 생존 가능성이 매우 높게 되고, 원심분리가 끝난 후에, 시험관 내에 *S. mutans*들의 밀도 역시 높아지게 되는 것이다. 두 번째 원인으로서는 대부분의 non-*S. mutans*들은 집락의 표층에 끈적이는 구조물인 피막(capsule)구조를 갖고 있기 때문에 원심력을 가했을 때 마찰력에 의해서 보다 쉽게 파괴되는 경향을 갖는데 비해서, *S. mutans*의 집락은 이러한 피막구조를 가지지 않는다는 점을 들 수 있다.

본 연구 결과에 의하면 원심분리를 통한 *S. mutans*의 선택 배양에서 원심 분리기의 최적 속도는 13,000 ×g 부근으로 사료되었다. 이는 20,000 ×g의 원심력이 가해졌을 경우, 25개의 실험군에서 모두에서 *S. mutans*의 값이 현저하게 떨어졌기 때문이다. 이것은 20,000 ×g에서는 non-*S. mutans* 뿐만 아니라 *S. mutans* 역시 원심력에 의해 파괴되었을 것이라는 추측을 가능하게 해준다. 결과적으로 본 실험에서는, *S. mutans*의 선별 배양에 있어서 13,000 ×g의 원심력을 가한 후 하층부 표본을 MSB 배지를 이용하여 배양하는 것이 가장 효율적이라는 것을 알 수 있었다.

본 연구의 제한점은 우선 *S. sobrinus*의 억제에 효

과적이라고 보고된 MS-MUT에 대한 특성을 충분히 고려하지 못한 점이다. 원심분리를 통하여 non-*S. mutans*의 비율을 감소시켰지만, 이 과정에서 non-*S. mutans*가 포함하고 있는 *S. sobrinus*의 비율을 확인하였다면 보다 구체적으로 MSB 배지와 MS-MUT 배지의 효과를 비교할 수 있었을 것이다. 두 번째 제한점은 사람의 타액을 이용한 미생물 실험이었기 때문에 개인 간의 높은 편차 값을 나타낸 점이었다. 특히, 개인에 따라 구강 내 환경이 다르기 때문에 타액에서 얻어진 세균들의 수에서 큰 차이가 나타났다. 본 연구에서 일본의 Hirasawa와 Takada¹²⁾와 다른 결과를 나타낸 것도 이런 점에 기인한다. 건강한 사람의 타액만을 이용한 본 실험과는 달리 Hirasawa와 Takada¹²⁾는 우식이 형성된 사람의 타액을 함께 이용했기 때문에 개인마다 구강 내 환경이 다르고 이것이 다른 결과를 초래할 수도 있었을 것이다. 따라서 향후 연구에서는 보다 많은 표본 수를 대상으로 최적의 원심분리속도라고 추정된 13,000 ×g 부근을 대상으로 구간을 세분화하여 추가 실험을 시행해 볼 필요가 있다고 생각된다. 또한, *S. mutans*가 다른 non-*S. mutans*에 비해 원심분리 과정에 생존 능력이 높은 원인으로 제시된 형태학적 차이를 이들 균주들의 미세 구조적 특성과 연관하여 분석해 볼 필요가 있을 것으로 사료되었다.

5. 결 론

본 연구의 목적은 첫째로, 기존의 *S. mutans* 선택 배지인 MSB 배지와 가장 최근에 개발된 선택배지인 MS-MUT 배지간의 선택 능력을 비교하고자 하였으며, 둘째, *S. mutans* 선택 배양시 다양한 속도의 원심력을 적용시킴으로써 원심분리과정이 *S. mutans* 선택배지의 선택성을 향상시킬 수 있는지를 규명하고자 하였으며 다음과 같은 결과를 얻게 되었다.

1. 원심분리를 하지 않는 타액과 원심분리를 시행한

타액 표본을 이용하여 MSB와 MS-MUT 배지 간에 선택배양을 했을 때 모두 기존의 MSB 배지가 새로 개발된 MS-MUT 배지에 비해 *S. mutans*에 대한 선택 능력이 뛰어난 것으로 나타났다.

2. 원심분리 후의 타액의 상층부에서는 *S. mutans*의 선택배양에 있어서 유의한 효과를 확인할 수 없었다. 반면, 하층부에서는 타액에 작용되는 원심력이 커질수록 *S. mutans*의 선택배양에 유의한 효과를 나타냈다.
3. 원심분리를 통한 *S. mutans*의 선택 배양에서 원심 분리기의 최적 속도는 13,000 ×g 부근으로 사료되었다.
4. 원심분리를 하지 않는 타액과 13,000 ×g의 속도

로 원심분리를 수행한 타액 간에 MSB와 MS-MUT 배지에 대해서 원심분리의 효과를 비교한 결과, MSB 배지에서는 원심분리를 통해서 non-*S. mutans*의 CFU가 3% 감소한 것에 비해, MS-MUT 배지에서는 무려 19%나 감소한 것으로 보아 MS-MUT 배지에서 원심력이 더 큰 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

이상의 연구결과에 의하면 *S. mutans*의 선택배양은 기존에 사용되어왔던 MSB 배지가 새롭게 개발된 MS-MUT 배지에 비해 더 유리하였으며, 이 과정에 있어서 13,000 ×g의 속도의 원심분리하는 것이 *S. mutans*의 선택성 향상에 도움으로 주는 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Gronroos L, Saarela M, Matto J, Tanner-Salo U, Vuorela A, Alaluusua S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. *Infect Immun* 1998;66(6):2595-2600.
2. Wu H, Fan M, Zhou X, et al. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* on the permanent first molars of the Mosuo people in China. *Caries Res* 2003; 37(5):374-380.
3. 박은아, 박근연, 박병래 외 4인. 불화규산의 *mutans* streptococci에 대한항균작용 및 인체돌연변이 유발가능성에 관한 연구. *대한구강보건학회지* 2001;25(4):415-435.
4. 정상호, 김종배, 백대일, 문희수. 다형연쇄구균이 유치우식발생에 미치는 영향. *대한구강보건학회지* 2002;26(4):471-481.
5. Bachrach G, Leizerovici-Zigmond M, Zlotkin A, Naor R, Steinberg D. Bacteriophage isolation from humans saliva. *Lett Appl Microbiol* 2003;36(1):50-53.
6. Martin C. Heterogeneity of brain heart infusion agar media (BHI): effects on the determination of the vancomycin and the teicoplanin minimal inhibitory concentrations (MIC) of *Staphylococcus aureus* strains. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52(8):450-454.
7. Hegde PP, Ashok Kumar BR, Ankola VA. Dental caries experience and salivary levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in 13-15 years old children of Belgaum city, Karnataka. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2005;23(1):23-26.
8. Wan AK, Seow WK, Walsh LJ, Bird PS. Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J* 2002;47(1):21-26.
9. Van Palenstein Helderma WH, Ijsseldijk M, Huis in 't Veld JH. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. *Arch Oral Biol* 1983;28(7):599-603.
10. Tanzer JM, Borjesson AC, Laskowski L, Kurasz AB, Testa M. Glucose-sucrose-potassium tellurite-bacitracin agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracin agar for enumeration of *Streptococcus mutans*. *J Clin Microbiol* 1984;20(4):653-659.
11. Kimmel L, Tinanoff N. A modified mitis salivarius medium for a caries diagnostic test. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6(5):275-279.
12. Hirasawa M, Takada K. A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. *Caries Res* 2003;37(3):212-217.
13. Hutchinson N, Bingham N, Murrell N, Farid S, Hoare M. Shear stress analysis of mammalian cell suspensions for prediction of industrial centrifugation and its verification. *Biotechnol Bioeng* 2006;95(3):483-491.
14. Ryan V, Hart TR, Schiller R. Size determination of *Streptococcus mutans* 10499 by laser light scattering. *Biophys J* 1980;31(3):313-324.

15. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 2001; 65(10):1028-1037.
16. Bergey DH, Holt JG, Krieg NR, Sneath PH. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore:Lippincott Williams & Wilkins;1994:231-238.
17. Vanden Abbeele A, Courtois P, Pourtois M. Peroxidase activity loss after filtration and centrifugation of whole saliva: Influence of citrate. *J Biol Buccale* 1992;20(2):91-96.
18. Soderling E, Isokangas P, Pienihakkinen K, Tenovuio J, Alanen P. Influence of maternal xylitol consumption on mother-child transmission of mutans streptococci: 6-year follow-up. *Caries Res* 2001;35(3):173-177.
19. Nascimento MM, Hofling JF, Goncalves RB. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res* 2004;38(5):454-463.
20. Klein MI, Florio FM, Pereira AC, Hofling JF, Goncalves RB. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. *J Clin Microbiol* 2004;42(10):4620-4626.
21. Beighton D, Brailsford S, Samaranyake LP, et al. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. *Community Dental Health* 2004;21:96-101.

Abstract

Improvement of selectivity for *Streptococcus mutans* by centrifugal procedure and selective media

Min-Young Kim, Ho-Keun Kwon, Baek-Il Kim

Department of Preventive Dentistry & Public Oral Health, Oral Health Research Center,
Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration College of Dentistry, Yonsei University

Key Words: centrifugal force, MSB, MS-MUT, selective culture, *Streptococcus mutans*

Objectives: The first purpose of this study was to evaluate differences in selective ability for *S. mutans* between existing MSB and MS-MUT which was recently developed by Hirasawa and Takada. The second purpose was to verify whether centrifugal forces were able to enhance selective ability in *S. mutans* selective media and to find out the optimized centrifugal force in vitro culture.

Methods: Salivary samples were collected from twenty five adults(Males: 13, Females: 12) and one milliliter of paraffin-stimulated saliva was collected for 5 minutes. MSB and MS-MUT media were used for *S. mutans* culture. All centrifugal conditions were in 4°C and 15 minutes and centrifugal forces were 1,000, 5,000, 13,000, and 20,000 × g. After the centrifugal process, we used with substratum layer for next procedure. The colony forming units(CFUs) of *S. mutans* and non-*S. mutans* in salivary samples were calculated by one experienced microbiologist. The t-test was used to compare CFUs between MSB and MS-MUT. The ANOVA test was used for evaluating of statistical significance in each centrifugal step.

Results: The CFUs of *S. mutans* in MSB media were similar to MS-MUT media in non centrifugal salivary samples. However, CFUs of non-*S. mutans* in MSB were significantly lower than MS-MUT (P<0.05). The lower stratum of centrifugal salivary sample with 13,000 × g showed the maximum CFUs of *S. mutans* and minimum CFUs of non-*S. mutans*.

Conclusions: This results showed that existing MSB media was superior to new MS-MUT in selective culture of *S. mutans*. The centrifugal forces played an efficient role for *S. mutans* selective culture and the optimized centrifugal force was considered as $13,000 \times g$.