

# 덴탈 바이오필름에서 분리한 세균의 주사전자현미경적 관찰 및 동정

장계원

진주보건대학 치위생과

색인 : 혀, 치은연상 바이오필름, 치은연하 바이오필름

[연락처] 장계원(우 660-757)경남 진주시 상봉서동 1142번지 치위생과

전화 : 055-740-1854 E-mail : 5806jgw@hanmail.net

▶ 본 연구는 2008년도 진주보건대학 연구비 지원지침에 의해 이루어졌음.

# 1. 서 론

치아우식증, 치은 및 치주감염은 덴탈 바이오 필름 또는 미생물에 의해 발생된다. 특히 치주조직에 염증을 일으켜 조직을 파괴하며 부착성을 소실시키기도 한다.

바이오필름(Biofilm)이란 표면에 모여진 세균과 효소의 다세포 집합체를 말하며, 생체막 형성 세균과 적당한 량의 물이 있다면 어떤 표면이든 생체막은 형성될 수 있다<sup>1)</sup>. 바이오필름은 생물체(Bio)의 막이란 뜻으로 세균을 의미하고 치면세균막(dental plaque)을 지칭하여 바이오필름이라고 하기도 한다. 영어권 국가에서는 플라그(plaque)를 보다 더 정확한 표현으로 바이오필름(Biofilm)이라는 용어를 쓴다.

치면세균막이란 치아표면에 부착되어 있는 미생물과 그 생성물을 주체로 하고 있는 유기성 치아부착물로서 구강내 자정작용에 의해서는 제거 될 수 없으며 잇솔질과 같은 물리적 방법에 의해서만 제거가 가능하다. 치아세균막 내에는 구균과 사상균이 많이 증식하며 구균에는 연쇄상구균, 사상균에는 Actinomyces가 가장 많이 증식한다<sup>2)</sup>. 그리고 치아나 치은 및 다른 구강 구조물 표면에 형성된 부드러운 무정형의 과립상 침착물로 육안적으로는 치주 탐침등의 예리한 기구로 긁거나 착색제를 사용했을 때만 볼 수 있다<sup>3)</sup>. 치면세균막 1mg 당(건중량) 약  $10^8$  개의 세균이 있고 평균적으로 한사람의 구강내에서 120~100mg의 치면세균막을 얻을 수 있다. 치면세균막 내에서의 미생물 분포는 부위에 따른 다양성과 채취 및 분리, 동정의 어려움 때문에 아직까지도 완전히 정립되지 않았다<sup>4)</sup>.

덴탈 바이오필름은 치밀하고 비석회화 된 겔 형태로 세균들 간의 세포간질 내에 있는 복합적인 세균 집락체이며, 획득피막과 치아, 치석 그리고 고정성, 가철성 수복물에 부착된다. 덴탈 바이오필름은 세균 보다는 미생물에 속할 수 있다. 그 유기체는 세균성 구균, 효모, 프로토조, 바이러스등이며 세균과 세균 간 기질로 이루어져 있고 유기물과 무기물이 20%, 수분이 80%를 차지한다. 이중 미생물은 고형물의 70~80%를 차지하고 치은연하 바이오필름에서는 비율이 증가한다. 이러한 구성률은 개개인마다 다를 수 있으며 한 개체에서도 치아 부위별로 다르게 나타날 수 있으며, 형성된 기간에 따라 구성 성분도 변화된다<sup>5)</sup>.

혀에 침착된 덴탈 바이오필름은 구취 뿐 만 아니라 개인의 심리적인 면에서도 바람직하지 않다. 혀의 배면은 유두와 음와로 되어 있기 때문에 표면적이 넓고 음와 부분은 타액 등에 의해 기계적인 세정작용도 받지 않기 때문에 미생물 밀도도 높다. 또한 박리된 상피세포에 부착되어 있는 세균은 세포당 100개 이상으로 주요 구성세균은 *Streptococcus salivarius*가 20%, *Streptococcus qmitis* 및 *Veillonella* 등이다. 또 *Corynebacterium*이나 *Propionibacterium* 같은 통성 혐기성의 그람양성간균도 높은 비율로 검출된다<sup>6)</sup>.

치은연상 덴탈 바이오필름은 유리치은연의 치관측 변연에 위치하고 타액 내 당단백질이 피막을 형성하여, 미생물이 선택적으로 피막에 부착한다. 인접면을 비롯하여 가장 많이 있는 곳은 구강위생관리가 불량한 순측의 치경부, 하악구치부 설측, 인접면 소와 열구에 분포하고 치은염, 치은연상치석, 치아우식증의 원인이 된다.

치은연하 덴탈 바이오필름은 유리치은의 치근측 변연에 위치하고 치은연상 바이오필름에 있는 세균이 하방으로 성장하고 치주낭에 의해 유지되어 치석을 덮으면서 바이오필름이 부착한다. 부착되지 않은 바이오필름은 부착치주 부위까지 연장되어 분포하고 치은염, 치주염, 치은연하치석의 원인이 된다. 또한 치은연상

생체막에 있는 미생물이 근단쪽으로 증식되어진 결과로 발생하며 치은염이나 치주염의 초기단계에서 치은연상 생체막이 더 많은 병소를 축적하여 강하게 영향을 주는 것으로 치주낭이 생기기 시작하고 치은연상 생체막이 치주낭속에 자리를 잡게된다<sup>7)</sup>.

치은연하 치면세균막 중 비부착성 치면세균막은 치은연하 상피에 직접 접촉되어 있거나 치은변연부에서 접합상피까지 연장되어 존재하며 운동성을 보이는 나선균, *spirochete*, 섬모균이 주종을 이룬다<sup>8)</sup>.

치태는 염증성 치주질환의 시작과 진행의 주요 원인요소이다. 치주병과 다른 치과질환에 대해 예방적인 수단으로 치태를 제거하고 환자를 교육하는 것이 치과위생사의 역할이다. 역학연구에서 환자의 구강위생상태와 치주질환 발현 및 심도는 역 상관관계가 있는 것으로 나타난다<sup>9)</sup>. 즉 향상된 구강위생 치료로 치태가 감소하면 결과적으로 치은염증과 질환이 감소한다<sup>10)</sup>.

조직침입성의 치태세균은 진행된 치주염이나 급성 치은염의 경우 나타나는 경우도 있고 감염에 대한 저항력이 저하된 경우 감염성 숙주에 침입성 치태세균이 존재하며 운동성이 있는 G(-) 간균이나 *spirochete* 가 많다<sup>11)</sup>.

치면세균막을 주사전자현미경으로 관찰하면, 가운데가 불룩하게 튀어나온 돔(dome) 모양들이 여러 개 모여 있는 것처럼 보이고 이를 절단한 모양은 마치 옥수수대(cone cob)나 시험관 닦는 솔(test tube brush) 모양을 하고 있음을 볼 수 있고 사상균들 사이에 여러 종류의 구균들이 많이 붙어 있다. 이러한 세균들은 치면에 붙어서 증식을 하며 대사 산물로서 ammonia나 hydrogen sulfide와 같은 물질을 내뿜어 악취를 유발시키고 lactic acid, acetic acid, propionic acid와 같은 산을 배설하며, 이러한 산은 치면세균막의 수소가 온농도지수를 PH 4.0~4.5까지 낮출 수 있다<sup>12)</sup>.

치은연상치태의 전자현미경상은 치밀한 선형균체(F)가 법랑질 표면에 붙어 있고 옥수수모양(CC)으로 표면으로부터 확장되었다. 이러한 복합체들은 구균이 선형균 둘레를 둘러싼 형태로 이루어져 있다. 치은연하치태의 전자현미경상은 G(-)간균이 구균에 붙어 시험관 청소용 솔모양(B)의 형태를 이룬것들이 나선균(S)으로 둘러 싸여 있다<sup>13)</sup>. 전자현미경으로 조직 내에 들어간 미생물들을 관찰하면 세균의 침입은 치주병을 유발하게 되고 치료 후에도 치주낭 내에서 세균이 노출된 상아세관으로 침입하여 증식하게 된다<sup>14)</sup>.

덴탈 바이오필름이 치면에 부착되어 제거되지 않고 장기간 경과하면, 구강내 타액 중 칼슘성분과 인을 흡수하여 석회화가 된다. 덴탈바이오 필름은 매일 제거하여야 하고 혀에 침착된 경우 구취 뿐 만 아니라 개인의 심미적인 면에서도 바람직하지 않다. 그리고 연령에 관계없이 영구치 및 유치에 발생하여 치은염과 치주질환의 유발·촉진에 중요한 역할을 하므로 덴탈 바이오필름의 실제적 분포는 질병 과정이라고 할 수 있다. 따라서 치면세막실습실 방문자의 건강한 치주관리를 하기위해 Scaling 예약자를 대상으로 혀, 치은연상, 치은연하 바이오 필름을 채취하여 세균 분포 및 주사전자현미경적 세균 형태 관찰 결과를 통해 치과위생사의 전문화된 덴탈 바이오필름 조절을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 실험 재료 및 방법

#### 2.1.1 시료

시료는 2008년 5월 1일부터 5월 30일까지 J보건대학 치위생과 치면세마실습실을 방문한 Scaling 대상자 20명을 Cotton plier, explorer, probe등을 이용하여 혀, 치은연상 바이오필름, 치은연하 바이오필름을 채취하였으며 시료 수는 총 60개였다.

#### 2.1.2 배지

세균분리용 배지는 Tryptic soy broth(TSB)배지를 사용하였고 계대 배양과 순수배양 배지는 Blood Agar 배지를 사용하였다.

TSB 배지의 조성은 표 1과 같다.

Table 1. The composition of Tryptic soy broth medium.

Tryptose	17g
Soytone	3g
Glucose	2.5g
Sodium chloride	5g
Dipotassium	2.5g
D.W	1000ml
pH	7.3

#### 2.1.3 세균의 형태

분리된 집락을 혈액천배지 ( Blood agar plate )에 접종하여 얻은 독립된 colony를 slide glass에 도말한 후 그람염색하고 광학현미경으로 검경하여 그 결과를 사진촬영 하였다.

#### 2.1.4 주사전자현미경

분리된 세균은 전처리 후 진공이온 코팅기(Hitachi E-1000)를 사용하여 100초 동안 각각10 $\mu$ m 두께로 도금한 후 주사전자현미경(Hitachi 3000)을 이용하여 25KV 조건에서 5000-7000배 확대하여 세균 형태를 관찰하였다.

#### 2.1.5 세균 동정

실험에서 분리된 균주는 생화학적 성상검사를 하여 균종을 동정하기 위해서 세균의 탁도를 맞춘 후 균액을 API kit strip에 분주하여 35 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 Automated Test for Bacteriology system (ATB)으로 동정하였다. (Fig.1)

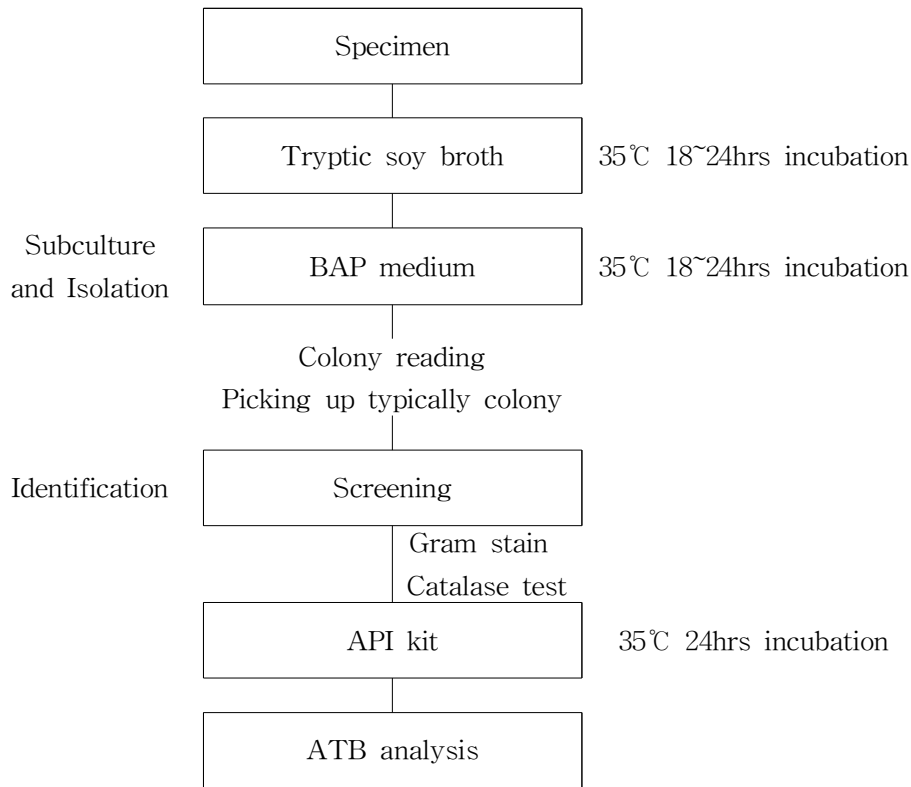
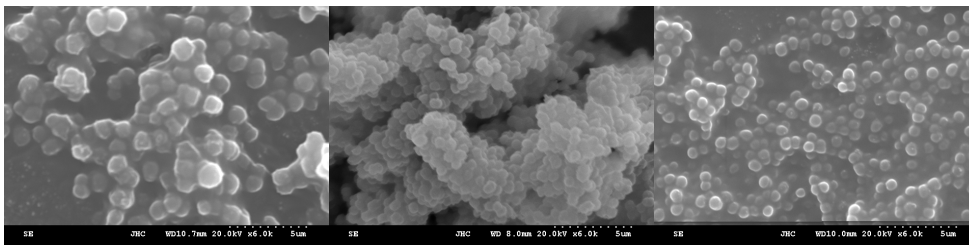


Fig.1. Identification Scheme for Bacteria.

### 3. 결과 및 고찰

3.1 혀, 치은연상 바이오필름, 치은연하 바이오필름의 주사전자현미경적 형태 관찰

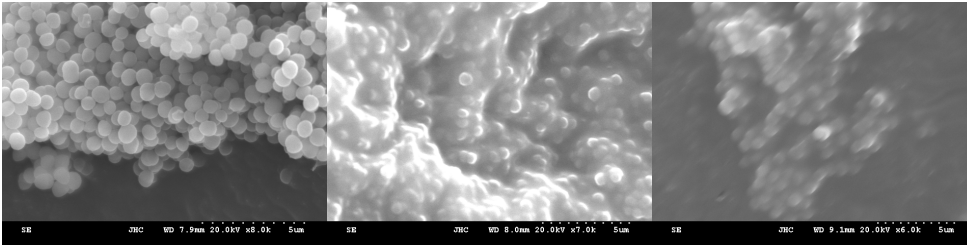
3.1.1 혀 바이오필름의 주사전자현미경적 형태 관찰



1)

2)

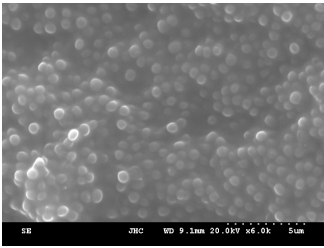
3)



4)

5)

6)

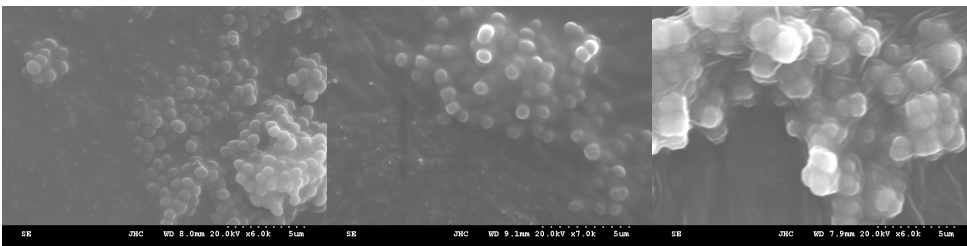


7)

Fig.2. Scanning electron micrography of tongue biofilm.

- 1) twenties male/tongue 2) twenties male/tongue 3) thirties male/tongue 4)twenties male/tongue  
5) twenties male/tongue 6) fifties female/tongue 7) twenties female/tongue

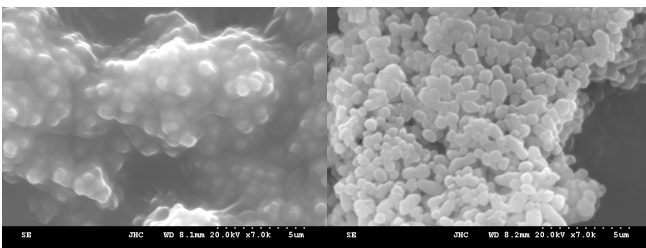
### 3.1.2 치은연상 바이오필름의 주사전자현미경적 형태 관찰



1)

2)

3)



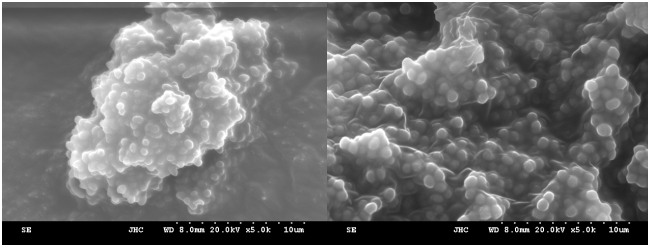
4)

5)

Fig.3. Scanning electron micrography of supra gingival biofilm.

- 1) thirties female/supra 2) twenties male/supra 3) twenties male/supra  
4) twenties male/supra 5) twenties male/supra

### 3.1.3 치은연하 바이오필름의 주사전자현미경적 형태 관찰



1) 2)

Fig.4. Scanning electron micrography of sub gingival biofilm

1) twenties male/sub 2) twenties male/sub

### 3.2 세균의 형태 및 특성

Blood Agar 배지상에서 대부분 부분용혈되는 녹색의 소형 colony가 관찰되었으며 분리된 colony을 그람염색한 결과 Gram 양성 구균인 *Streptococcus* (그림5,6) 및 *Staphylococcus*와 그람음성 간균이 나타났다.

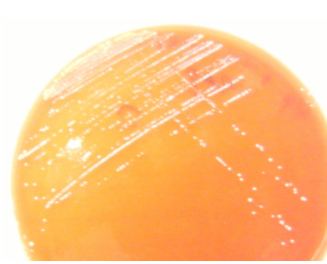


Fig.5. *Streptococcus mitis* growing on Sheep blood agar

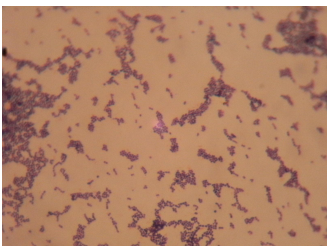


Fig.6. Microscopic morphology of *Streptococcus mitis* on Gram stain

### 3.3 바이오필름에서의 세균 분포

대상자 20명의 혀에서 *Granulicatolla adiacens*, *Gemella morbillorum*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Aerococcus viridans*, *Streptococcus equinus*, *Leuconostoc spp.*, *Gemella haemolysans*, *Lactococcus lactis*, 세균이 각각 1, 3, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 1 종 검출되었고, 치은연상 바이오필름에서는 *Aerococcus viridans*, *Gemella haemolysans*, *Leuconostoc spp.*, *Gemella morbillorum*, *Pseudomonas fluoescens* 세균이 각각 1, 2, 2, 1, 1 종 검출되었다. 치은연하 바이오필름에서는

*Leuconostoc spp.* , *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus salivarius* 세균이 각각 1, 1, 1 종 검출되었다.

구강내 각 부위에 있어서 세균분포는 표2와 같다.

Table 2. The bacteria strains isolated from dental biofilm

No.of patient	Position of Biofilm	Identification	No.of patient	Position of Biofilm	Identification
1	tongue	<i>Granulicatella adiacens</i>	11	tongue	<i>Leuconostoc spp.</i>
	supra	ND		supra	ND
	sub	ND		sub	ND
2	tongue	<i>Gemella morbillorum</i>	12	tongue	ND
	supra	ND		supra	ND
	sub	ND		sub	<i>Leuconostoc spp.</i>
3	tongue	<i>Streptococcus mitis</i>	13	tongue	<i>Gemella haemolysans</i>
	supra	ND		supra	ND
	sub	ND		sub	ND
4	tongue	<i>Streptococcus sanguinis</i>	14	tongue	ND
	supra	<i>Aerococcus viridans</i>		supra	ND
	sub	ND		sub	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
5	tongue	<i>Aerococcus viridans</i>	15	tongue	<i>Gemella morbillorum</i>
	supra	ND		supra	ND
	sub	ND		sub	<i>Streptococcus salivarius</i>
6	tongue	<i>Streptococcus mitis</i>	16	tongue	<i>Aerococcus viridans</i>
	supra	ND		supra	<i>Leuconostoc spp.</i>
	sub	ND		sub	ND
7	tongue	ND	17	tongue	<i>Gemella morbillorum</i>
	supra	<i>Gemella haemolysans</i>		supra	ND
	sub	ND		sub	ND
8	tongue	ND	18	tongue	<i>Lactococcus lactis spp lactis</i>
	supra	<i>Leuconostoc spp.</i>		supra	ND
	sub	ND		sub	ND
9	tongue	ND	19	tongue	ND
	supra	<i>Gemella haemolysans</i>		supra	<i>Gemella morbillorum</i>
	sub	ND		sub	ND
10	tongue	<i>Streptococcus equinus</i>	20	tongue	ND
	supra	ND		supra	<i>Pseudomonas fluoescens</i>
	sub	ND		sub	ND

1) ND: Non Detected

## 4. 결 론

본 연구는 J보건대학 치위생과 치면세마실습실을 방문한 scaling 예약자 20명을 대상으로 혀 및 치은연상 바이오필름과 치은연하 바이오필름을 채취하여 세균 분포 및 주사전자현미경적 세균 형태를 관찰 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 혀, 치은연상 바이오필름, 치은연하 바이오필름의 세균을 혈액 한천 배지상에서 colony를 그람염색한 결과 그람양성구균과 그람음성간균이 다양하게 분포하고 있음을 볼 수 있었다.

- 2) 주사전자현미경 관찰한 결과 연쇄상모양과 포도송이모양, 막대기모양으로 나타났다.
- 3) 분리된 균주를 동정한 결과 혀에서는 *Granulicatolla adiacens*, *Gemella morbillorum*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Aerococcus viridans*, *Streptococcus equinus*, *Leuconostoc* spp. , *Gemella haemolysans*, *Lactococcus lactis*, 세균이 각각 1, 3, 2, 1, 2, 1, 1, 1, 1종 검출되었다.
- 4) 치은연상 바이오필름에서는 *Aerococcus viridans*, *Gemella haemolysans*, *Leuconostoc* spp. , *Gemella morbillorum*, *Pseudomonas fluoescens* 세균이 각각 1, 2, 2, 1, 1종 검출되었다.
- 5) 치은연하 바이오필름에서는 *Leuconostoc* spp. , *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus salivarius* 세균이 각각 1, 1, 1 종 검출되었다.

## 5. 참고 문헌

1. Wilkins E.M. Clinical Practice of the Dental Hygienist, 9th Ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.2005.
2. 예방치학연구회. 현대예방치학. 1판. 서울: 군자출판사; 2007:56.
3. 최성호, 고은경, 김지영 외6. 치주학. 1판. 서울: 현문사; 2008:34.
4. 김영권, 한만덕. 구강미생물학. 2판. 서울: 고문사; 2000:242-246.
5. 김숙향, 오정숙, 정순희 외9. 임상치위생학. 9판. 서울: 대한나래출판사; 2007:290-296.
6. 이형숙, 박정문. 구강미생물학. 1판. 서울: 청구문화사; 1994:245.
7. 유봉현. 치과위생학개론. 1판. 서울: 연세대학교출판부; 2007:263-276.
8. 김연화, 김정숙, 남용욱 외13인. 치면세마론. 개정4판. 서울: 청구문화사; 2006:33.
9. Wirthlin MR Amitage GC. Dental plaque and calculus: Microbial biofilms and periodontal diseases. In Rose LF, Mealey BL(eds). Periodontics, Surgery, Medicine, and Implants. Elsevier Mosby, St Louis; 2004:99-116.
10. 이용무, 김숙향, 유미현 외3인. 치과위생사를 위한 치주학. 1판. 서울: 군자출판사; 2008:66.
11. Caranza, F.A, Gilckman's Clinical Periodontology, 6th ed. Philadelphia: W. B Saunders Co. 1984.
12. 김종배, 백대일, 문혁수 외13. 임상예방치학. 개정4판. 서울: 고문사; 2006:79.
13. Used with permission from Listgarten MA. Structure of the microbial flora associate with periodontal health and disease in man. J Periodontal; 1976: 47:1-18.
14. 김종관, 윤중호. 치주치료 1판. 서울: 신흥인터내셔널; 1997:94

# Identification and morphology of scanning electron microscopy(sem) of bacteria isolated from dental biofilm

Gye-won Jang

Dept. of Dental Hygiene, Jinju Health College

Key words: tongue, supragingival biofilm, subgingival biofilm.

In this study, specimens such as tongue, supragingival and subgingival biofilm were taken from total 20 scaling subjects who visited the oral prophylaxis practice lab at department of dental hygienics, J Health College in order to observe bacterial distributions and morphology using scanning electron microscopy(sem). as a result, this study came to the following conclusions:

1. According to observation of tongue, supragingival and subgingival biofilm through sem, it is found that there are round colonies of gram-positive cocci and gram-negative bacilli on blood agar medium.
2. The observation of bacterial morphology on dental biofilm through sem, cocci in chain cocci in cluster and bacillus(rod) respectively.
3. For tongue biofilm, it is found that a variety of bacterial species are detected, such as *Granulicatolla adiacens*(1), *Gemella morbillorum*(3), *Streptococcus mitis*(2), *Streptococcus sanguinis*(1), *Aerococcus viridans* (2), *Streptococcus equinus*(1), *Leuconostoc* spp.(1), *Gemella haemolysans* (1) and *Lactococcus lactis* spp.(1) respectively.
4. For supragingival biofilm, it is found that a variety of bacterial species detected,

such as *Aerococcus viridans*(1), *Gemella haemolysans*(2), *Leuconostoc* spp.(2), *Gemella morbillorum*(1) and *Pseudomonas fluoescens* (1) respectively.

5. For subgingival biofilm, it is found that a variety of bacterial species detected, such as *Leuconostoc* spp.(1), *Staphylococcus lugdunensis*(1) and *Streptococcus salivarius*(1) respectively.