

이하선 타액의 세균응괴 및 알칼린 포스퍼타제의 수준에 의한 *Streptococcus sanguis* 균주의 유형화에 관한 연구

서울대학교 치과대학 구강미생물학교실

장복실 · 김재욱 · 이장희 · 김각균 · 최선진

= Abstract =

A Study on the Grouping of *Streptococcus sanguis* Strains by Parotid Saliva-Induced Aggregation and Alkaline Phosphatase Level

Bok-Sil Jang, Jae-Wook Kim, Zang-Hee Lee, Kack-Kyun Kim and Son-Jin Choe

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

Streptococcus sanguis displays considerable phenotypic and genotypic diversity, which makes it difficult to classify within a taxonomic framework.

The two phenotypic properties of these organisms, the alkaline phosphatase production and parotid saliva-induced aggregation were reported useful in grouping certain strains of this species. Handley et al. reported that the ability or inability to produce alkaline phosphatase corresponds respectively with the presence or absence of aggregation property of the strains studied. In the present investigation, we studied on the grouping of *S. sanguis* which includes either the laboratory strains or the strains isolated from dental caries lesions and classified as *S. sanguis* based on the scheme of Hardie and Bowden. A spectrophotometric measurement of sedimentation was used to estimate the size of clumps formed after incubation of *S. sanguis* with parotid saliva.

The alkaline phosphatase activity was determined spectrophotometrically by measuring the p-nitrophenol released when bacterial cells were incubated with the enzyme substrate, p-nitrophenyl phosphate. To check whether or not the use of intact bacterial cells were adequate for the enzyme detection disruptive cells were also used.

The following results were obtained.

1. *S. sanguis* strains exhibited characteristic sedimentation patterns when the cells were aggregated by parotid saliva.
2. According to the level of alkaline phosphatase determined, *S. sanguis* strains could largely be divided into three groups: strong producer, poor producer, and non-producer.
3. The bacterial strains showing no alkaline phosphatase activity when assayed with intact cells neither exhibited the activity when broken cells were used as an enzyme source.
4. Coykendall's Group I and III strains of *S. sanguis* were aggregated by parotid saliva.
5. According to the report of Handley, the Group III strain of Coykendall should show "++" or "--" pattern in alkaline phosphatase production and aggregation. However the present study showed that the corresponding pattern was "-+".
6. The laboratory strains 10557 and 9811 belonging to Group II of Coykendall were positive and negative respectively in alkaline phosphatase production and both negative in aggregation.

Key Words: *Streptococcus sanguis* grouping, Alkaline phosphatase, Salivary agglutination

서 론

Viridans streptococci 중에서 아지닌과 이스쿨린을 가수분해하며 자당으로부터 glucan(dextran)을 생산하는 균주들을 White와 Niven¹⁹⁾은 *Streptococcus sanguis*라 명명하였다. *S. sanguis* 균주는 아급성 세균성 심내막염을 가진 환자의 혈액에서 처음 분리되었다. 당시, 이 세균은 인후에서는 분리할 수 없었지만 감염된 상악동과 발저한 치아에서는 분리되었다.

*S. sanguis*의 주된 서식처는 치아균태(치태)임을 Carlsson⁴⁾은 밝혔고 그는 세균 군락의 모양이 *S. sanguis*와 유사한 치태 streptococci를 검출하였는데 이 균주는 특징적인 glucan을 생산하였지만 아지닌 또는 이스쿨린 분해능은 없었다. 이 균주들은, glucan을 생산하는 성상을 제외하고는 *Streptococcus mitior*를 닮았지만, Carlsson³⁾은 이 균주들의 서식처가 치태인 점과 수리분류학적 연구성적에 근거하여 *S. sanguis*의 한 유형(type)이라고 하였다. 한편 Colman과 Williams⁶⁾는 glucan을 생성하지만 아지닌 또는 이스쿨린 분해능이 없는 균주들은 glucan생산성 *S. mitior*로 분류하였다. *S. sanguis*는 이처럼 생화학적으로 양분될 뿐 아니라 항원성으로 볼 때에도 이질성이 있음이 밝혀졌다. Hardie와 Bowden¹⁵⁾은 구강 streptococci를 동정하기 위한 짧은 도식(scheme)을 고안하였는데 mannitol과 sorbitol에서의 산생성, 아지닌과 이스쿨린의 분해, 포도당으로부터 acetoin의 생산, 자당으로부터 dextran의 생산, 그리고 초코렛 agar위에서 H₂O₂의 생성 등에 관한 7가지의 생화학적 검사를 실시하여 구강 streptococci를 5가지의 종으로 동정하였다. *S. sanguis*로 동정되는 균주는, 아지닌, 이스쿨린, dextran, 그리고 H₂O₂ 검사에서 양성을 보였고 기타의 검사에서는 음성반응을 보였다(표 1). Hardie와 Bowden은 기존의 도식으로 용이하게 동정할 수 없는 소수의 구강 streptococci의 동정에 관해서는 고려치 아니하였다. 한편 Facklam¹⁰⁾은 1,000개 이상의 임상균주에서 얻은 성적에 근거하여 viridans streptococci를 동정하는 도식을 고안하였다. 이 도식에서 시행하는 검사는 메니톨, 락토스, 이눌린 및 래피노즈에서의 산생성; 히푸레이트, 아지닌 및 이스쿨린의 분해; 리트머스 밀크에서의 생장; 40% 담즙에의 관용; 자당으로부터 glucan 생성; 그리

고 용혈(alpha 또는 none)이다. 이 도식에서, 그는 *S. sanguis*를 *S. sanguis* 생물형 I 과 *S. sanguis* 생물형 II로 구별하였는데 이 두 군은 다음의 특징에서 구별되었다(표 1). 이눌린에서 산생성, 아지닌 분해, 그리고 alpha-용혈성인 것은 *S. sanguis* 생물형 I로, 반면 이눌린 불이용, 이스쿨린 비분해, 그리고 래피노즈에서 산생성하는 것을 *S. sanguis* 생물형 II로 동정하였다.

Coykendall과 Specht⁸⁾는 17개의 *S. sanguis* 실험실균주를 사용하여 이 균주들의 유전물질(DNA)에 들어있는 guanine + cytosine 함량과 염기서열의 homology(동질성)를 분석하여 세균의 *S. sanguis*를 분별할 수 있었다. 그중 제 1군과 제 3군 사이의 DNA 동질성은 67°C에서 40-60%이었으나 제 1군 및 제 3군에 대한 제 2군의 동질성은 훨씬 낮았다. 그리고 제 1군과 제 3군에 속한 균주들은 아지닌과 이스쿨린을 분해하고 이눌린을 발효하였으나 제 2군의 균주들은 이 물질들에 대한 반응에서 모두 음성이었다. 따라서 제 1군과 제 3군의 균주들은 *S. sanguis*의 아종(subspecies)로 생각할 수 있었으나 제 2군의 균주들은 *S. sanguis*라고 지칭할 수 없다고 그들은 보고하였다.

Coykendall과 Gustafson⁷⁾은 근래에 위에 기술한 *S. sanguis* 군들의 genotype(유전자형)을 구별할 수 있는 생화학적 방법을 보고하였다. 상기한 제 1군(type 1)의 균주들은 알칼린 포스퍼타제를 생산하였으나 전분은 산성화 하지 못하였다. 상기한 제 3군에 속하는 다른 균주형은 알칼린 포스퍼타제는 생산 못하고 전분은 산성화하였다. 이들은 아울러 감염에서 채취한 89개의 *S. sanguis* 분리균주의 분석에서 제 3군(type 3)이 전체적으로 약간 우세하게 분리되었고 제 1군(type 1)은 심내막염에서 더 빈번히 검출되었다고 보고하였다. Wyatt와 Handley²⁰⁾는 Facklam의 도식에 의거하여 동정한 *S. sanguis* 생물형 I의 연구에서 어떤 균주는 peritrichous fibril을 소유하고 어떤 것은 tufted fibril을 소유한다고 보고하였다. 이 두 아군(subgroup)을 구별할 수 있는 생화학적 검사는 효소 알칼린 포스퍼타제의 생산 유무로서, peritrichous fibril 소유균주에는 이 효소가 함유되어 있고 tufted fibril 소유균주에는 이 효소가 결여되어 있다고 하였다. 또 이 두 아군을 구별할 수 있는 다른 검사로서는 이하선 타액에 의한 세균의 응괴로서, peritrichous fibril을 소유한 *S. sanguis* 생물형 I은 이 타액으로 응괴되

Table 1. Comparison of 2 short biochemical test schemes for the identification of *S. sanguis*

	Hardie and Bowden ^a		Facklam ^b	
		Biotypic I	Biotypic II	
Mannitol	-	-	-	
Sorbitol	-			
Lactose		+	+	
Inulin	+(98%) ^c	+	-	
Arginine	+	+		
Esculin	+		-	
Raffinose			+	
Acetoin	-			
Dextran	+	+		
H ₂ O ₂	+			

^a Hardie, J.M. and G.H. Bowden: Physiological classification of oral viridans streptococci, J. Dent. Res. 55(spec. issue A):166-176, 1976.

^b Facklam, R.R.: Physiological differentiation of viridans streptococci. J. Clin. Microbiol. 5:184-201, 1977. ^c Property put in the scheme by the author based on the data from the Group I :B of Carlsson³) and the *S. sanguis* (type I) of Hardie¹⁶).

^c The percentage in parenthesis indicates the number of strains giving positive reaction.

고 tufted fibril을 소유한 생물형 I 은 응괴되지 않거나 응괴가 일어나더라도 양성반응에 비하여 극히 미미하다고 하였다²⁰). 이처럼 *S. sanguis* 균주 중에서 알칼린 포스퍼타제 생산균주는 이하선타액에 의하여 응괴되고 이 효소의 비생산균주는 응괴치 못한다는 보고에 근거하여 본 실험에서는 그동안 이 교실에서, 치태에서 분리하고 Hardie와 Bowden의 도식에 의거하여 동정하여 사용하던 *S. sanguis* 균주와 실험실균주를 사용하여 알칼린 포스퍼타제의 소유여부와 이하선 타액에 의한 이 균주들의 응괴여부가 일치하는지를 연구하였다. 그리고 *S. sanguis* 균주의 알칼린 포스퍼타제가 세 균체의 어느 곳에 위치하는가를 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세균 및 배양

연구에 사용한 *S. sanguis* 균주는 사람의 치아 균태에서 분리하여 동정한 것¹⁾과 실험실 보존균주를 사용하였다. 이 균주들은 통상 실험실에 냉동건조하여 보존하고 working stock은 냉

동(-70°C)하여 보관하며 사용하였다. 세균의 배양은 냉동된 균주를 녹여 0.3%의 yeast extract를 첨가한 Brain Heart Infusion(BHI)액체 배지에 접종하여 1-2차 계대한 후 같은 배지에 식균하여 CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. 알칼린 포스퍼타제 측정에 사용한 세균은 상기한 배지에 yeast extract를 첨가하지 아니하고 배양하였다.

2. 이하선타액에 의한 세균의 응괴

연구에 사용한 이하선타액은 20대 남자에서 사탕자극으로 분비된 타액을 Lashley cannulae를 이용하여 냉각된 용기에 채취하여 실험에 바로 사용하였다. 응괴에 사용할 세균은 위에서 처럼 배양한 세균을 4°C에서 10,000×g로 10분간 원침하여 수집한 후 buffered KCl(50mM KCl buffered with 1mM K₂HPO₄ and 1mM KH₂-PO₄)¹⁰)로 2회 세척한 후 OD₆₆₀값이 1.0이 되게 buffered KCl에 현탁하여 4°C에 보관하며 사용하였다.

세균응괴의 측정을 위해서는 세균현탁액 0.5ml과 이하선 타액 0.5ml을 1회용 polystyrene semimicro cuvette(Fisher Scientific, Pittsburgh, U.S.A.)에 넣고 혼합하였고, 기준균의 큐벳에는 이하선 타액 대신에 완충된 KCl용액을 넣었다. 그 후 응괴가 일어나게 하기 위하여 큐벳을 37°C에서 30분간 배양시키고, 다시 큐벳을 거꾸로 회전시켜, 내용물을 섞은 즉시부터 응괴의 침전을 기록하였다. 침전의 측정은 상온에서 15분간격으로 105분 혹은 120분까지 OD₆₆₀ 값을 UV-Spectrophotometer(Beckman Model 35)로 시행하였다. 실험은 두개 한벌(duplicate)로 시행하였다.

3. 알칼린 포스퍼타제 assay

세균은 BHI액체배지(통상 100ml)에 접종하여 CO₂ incubator에서 18시간 배양하였다. 배양한 세균은 4°C에서 10,000×g로 10분간 원침하여 수집하고 생리식염수로 2회 세척한 후, 세균현탁액의 농도가 OD₆₆₀에서 1.5가 되도록, Magnesium acetate가 2.0mM되게 첨가된 Tris buffer(0.05M, pH 9.0)¹³) (이하 Tris-Mg buffer로 약칭)에 현탁하여, 측정하는 알칼린 포스퍼타제의 효소원으로 사용하였다.

세균현탁액 1ml를 9ml의 Tris-Mg buffer에 섞은 후 37°C로 맞춘 배양기에 넣어 용액의 온도를 37°C가 되도록 배양한 후 2ml의 p-

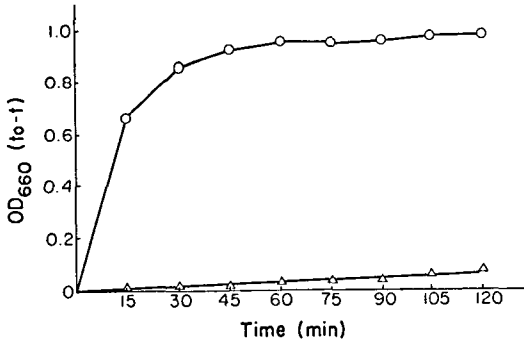


Fig. 1a. Sedimentation of *S. sanguis* strain 49(2) after incubation with parotid saliva(○) and buffered KCl(△);to and t:time at the beginning and the end of sedimentation measurement.

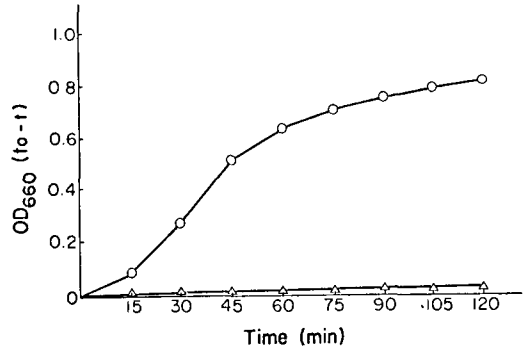


Fig. 1b. Sedimentation of *S. sanguis* strain 38(1) after incubation with parotid saliva(○) and buffered KCl(△);to and t:time at the beginning and the end of sedimentation measurement.

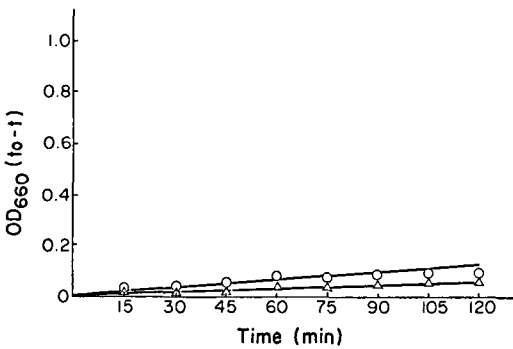


Fig. 1c. Sedimentation of *S. sanguis* strain 47(2) after incubation with parotid saliva(○) and buffered KCl(△);to and t:time at the beginning and the end of sedimentation measurement.

nitrophenyl phosphate(Tris-Mg buffer에 12mg/ml되게 한 것)를 가하여 반응이 일어나게 하고 37°C에서 계속 배양시키며 15분 간격으로 혹은 일정 시간 경과 후 2ml을 취하여, 4ml의 0.2M NaOH에 더하여 반응을 중지시키고 OD₄₂₀ 값을 Spectronic 21D(Milton Roy)로 읽었다. 측정된 알칼린 포스퍼타제의 양은, p-nitrophenol을 이용하여 그린 표준곡선으로부터 구하였다.

4. 세균의 파괴

OD₆₆₀에서 세균의 농도를 1.5가 되도록 준비한 세균현탁액을 사용하여 세균을 파괴시키고 파괴 전과 파괴 후의 알칼린 포스퍼타제 활성을 측정하였다. 세균의 파괴¹²⁾는 1) 4°C에서 15분간 초음파로 파절하든가, 2) 24°C 항온수조에서 진탕하면서 1.0%(v/v)의 toluene에서 20분간 처리하여 시행하였다. 처리 후, 10,000

×g로 20분간 원심시켜 상청액은 수집하고 pellet은 상청액과 동일량의 Tris-Mg buffer에 현탁시켜 알칼린 포스퍼타제 활성을 측정하였다.

성 적

1. 이하선 타액에 의한 세균의 응피

이하선 타액을 첨가한 세균현탁액과 기준군의 현탁액에서 측정된 개개의 균주의 OD₆₆₀의 감소(ΔOD₆₆₀)를 시간의 함수로서 그래프로 나타내도록 하였다. 균주들은 특징적인 침강패턴을 보였고 그중 세개의 균주에서 얻은 그래프를 그림 1에 표시하였다. 응피반응 혼합액의 105분 동안의 침강에서 얻은 모든 균주의 OD₆₆₀ 값은 표 2에 기록하였고 또 *S. sanguis* 균주 20(2)의 OD₆₆₀ 값을 100%로 설정할 때 다른 균주들의 백분값을 구하여 표 2에 함께 기재하였다.

그림 1a는 *S. sanguis* 균주 49(2)의 침강패턴을 보인다. 이 균주에서는 광학적 밀도의 최대 감소가 60분경에 일어났다. 그리고 기준군에서는 반응 전체 기간에 걸쳐 침강이 보이지 아니하였다. *S. sanguis* 균주 38(1)이 보인 침강패턴을 그림 1b에 표시하였는데, 이 균주에서는 침강이 비교적 서서히 진행되었고 측정 개시 120분에도 다소의 침강이 계속되는 경향을 보였다. 기준군에서는 거의 침강이 일어나지 아니하였다. 그림 1c에는 *S. sanguis* 균주 47(2)의 침강패턴을 표시하였다. 침강은 매우 미미하게 일어났고 측정된 120분간 동안 계속 침강하는 양태를 보였다.

2. 알칼린 포스퍼타제의 수준

이 효소의 측정에 필요한 적정 반응 시간과 측정하는 효소가 일정한 활성을 보이는 범위를 찾기 위하여 time-course 실험과 효소농도(즉 세균농도)와 효소 활성간의 관계를 조사하였다. 이 효소의 기질인 p-nitrophenyl phosphate (PNPP)의 분해반응은 반응시간과는 비례관계를 그리고 반응에 사용한 효소농도와 효소활성도 직선관계를 보였다(테이타 기재 없음). 따라서 이하에 기술하는 알칼린 포스퍼타제의 측

정은 비례관계를 유지하는 반응시간과 효소농도범위에서 시행하였다.

사용한 모든 균주에서 측정하여 얻은 알칼린 포스퍼타제의 수준은 표 3에 기재하였다. 검출된 이 효소의 수준에 의거해서 모든 균주를 세균, 즉 높은 수준의 효소를 소유한 것, 낮은 수준의 것, 그리고 이 효소를 소유하지 않은 것으로 나눌 수 있었다. 역시 표 3에 기록하였듯이 이 효소의 생산과 이하선타액에 의한 세균응괴 관계를 조사하면, 두 현상이 반드시 일치

Table 2. Parotid saliva-aggregation of *S. sanguis* strains

Strain	Aggregation ^a	OD reduction relative to strain 20(2)(%)
20(2)	1.227	100
10556	1.219	99.3
40(1)	1.179	96.1
M5	1.093	89.1
10558	1.026	83.6
804	1.025	83.5
43(2)	0.967	78.8
45(2)	0.949	77.3
36(1)	0.942	76.8
43(1)	0.932	76.0
MPC1	0.922	75.1
22(1)	0.913	74.4
35(1)	0.913	74.4
49(2)	0.913	74.4
46(1)	0.908	74.0
31(1)	0.882	71.9
HPC1	0.860	70.1
32(1)	0.856	69.8
45(1)	0.844	68.8
66×49	0.839	68.4
16(2)	0.822	67.0
38(1)	0.780	63.6
35(2)	0.763	62.2
17(2)	0.758	61.8
38(2)	0.750	61.1
47(2)	0.009	0.7
10557	-0.021	-1.7
9811	-0.072	-5.9

^a Calculated as ΔOD_{660} saliva- ΔOD_{660} buffer after 105 min sedimentation.

Table 3. Alkaline phosphatase activity and parotid saliva-aggregation of *S. sanguis* strains

Strain	Alkaline phosphatase activity ^a	Aggregation by parotid saliva
47(2)	57.7	-
10557	34.1	-
35(1)	27.1	+
M5	17.7	+
10558	15.8	+
66×49	15.0	+
38(1)	2.3	+
35(2)	1.7	+
16(2)	0.7	+
49(2)	0.6	+
43(2)	0.4	+
31(1)	0.3	+
36(1)	0.1	+
38(2)	0.1	+
46(1)	0.1	+
10556	0	+
804	0	+
9811	0	-
HPC1	0	+
MPC1	0	+
17(2)	0	+
20(2)	0	+
22(1)	0	+
32(1)	0	+
40(1)	0	+
43(1)	0	+
45(1)	0	+
45(2)	0	+

^a Expressed as nmoles of PNPP hydrolysed/min/ 1×10^8 cells.

Table 4. Effects of disruptive procedures on the cell-bound and released alkaline phosphatase activity of *S. sanguis* strains 16(2) and 47(2)

Treatment	Strain 16(2)				Strain 47(2)			
	Bound	Released	Total	% Activity	Bound	Released	Total	% Activity
None	0.23	0.17	0.40	100	21.26	10.32	31.58	100
Sonication	0.50	1.69	2.19	548	13.70	49.07	62.77	199
Toluene	18.78	0.17	18.95	4738	72.37	5.02	77.39	245

^a Expressed as nmoles of PNPP hydrolysed/min/1 × 10⁸ cells.

하지는 아니 하였다. *S. sanguis* 균주 47(2)와 10557은 높은 효소 활성을 보였지만 세균의 응괴는 일으키지 않았다. 한편, 알칼린 포스퍼타제 활성은 없었지만 세균응괴는 균주 9811을 제외한 모든 균주에서 일어났다.

3. 알칼린 포스퍼타제가 존재하는 세포의 위치

본 연구에서 알칼린 포스퍼타제의 측정은 파괴되지 않은 전균을 효소원으로 사용하기 때문에, 이 효소가 검출된 균주에 있어서는 효소가 세포에 존재한다고 생각할 수 있고, 효소가 검출되지 않은 균주에서는 이 효소가 세포 내부에는 존재하여도 세균세포에는 노출되어 있지 않기 때문에 검출되지 않는다고 생각할 수 있다. 이 점을 점검하기 위하여 세균을 두 가지 방법으로 파괴한 다음 원침하여 얻은 침전물과 상청액에 들어있는 효소를 측정하였다(표 4). 표에서 보듯이, 높은 수준의 효소이전 또는 낮은 수준의 효소이전 간에 이 효소의 소유 균주에서는 세균을 파괴하여 측정할 때 그 활성이 높아짐을 관찰할 수 있었다. 낮은 수준의 효소 활성을 보이는 *S. sanguis* 균주 16(2)에서는 세균을 파괴할 때 총 효소활성이 파괴 전에 비하여 500%(초음파 파절인 경우) 또는 4700%(톨루엔 처리인 경우)로 증가하였다. 높은 수준의 효소를 소유한 *S. sanguis* 균주 47(2)는 초소리와 톨루엔으로 세균을 파괴할 때 파괴 전에 비하여 각각 200%와 240% 정도로 그 활성이 증가하였다. 알칼린 포스퍼타제 활성을 보이지 않은 균주는 세포를 파괴하여도 활성이 나타나지 않았다.

고 찰

서론에서 언급하였듯이 *S. sanguis*의 분류에는 현재 대별하여 2개의 생화학적 검사 도식이

Table 5. Summary data from studies by Coykendall et al., Handley et al., and the author with respect to the tests on alkaline phosphatase production and parotid saliva-aggregation

Coykendall et al. ^a	AP	Handley et al. ^b	Present study			
			AP	Agg	AP	Agg
Group I (genotype 1)	+	Biotype I	+	+	+	+
			or	-	-	
Group II (<i>S. sanguis</i> -unlike)		Biotype II			+	-
Group III (genotype 2)	-	Biotype I	+	+	-	+
			or	-	-	

Abbreviations: AP-Alkaline phosphatase
Agg-Parotid saliva-induced aggregation

^a Reference No. 7.

^b Reference No. 14.

사용되고 있다. Hardie와 Bowden¹⁵⁾의 도식에서는 아지닌과 이스쿨린의 분해가 중요한 판단기준으로 사용되고 있고 Facklam¹⁰⁾의 도식에서는 2개의 생물형으로 *S. sanguis*를 분류하면서 아지닌의 분해, 이스쿨린의 비분해, 이놀린 및 래피노즈의 발효능이 중요한 생화학적 검사 대상이 되어있다. 생화학적 검사 측면에서 보면 Hardie와 Bowden¹⁵⁾도식에 의해 동정한 *S. sanguis*는 Facklam¹⁰⁾도식에 의한 생물형 I을 내포하게 된다. 그리고 Facklam도식의 생물형 II는 이스쿨린 분해능과 이놀린 발효능이 없는 균주이므로 Hardie와 Bowden¹⁵⁾도식에 의거한 *S. sanguis*에는 포함되지 않는 것이다. 생물형 II의 *S. sanguis*는 Coykendall과 Specht⁸⁾가 DNA염기서열 동질성 연구에서 언급한 제 2군에 해당되는 것으로 생각된다.

알칼린 포스퍼타제를 생산한다고 Coykendall

과 Specht⁸⁾가 보고하고 또 유전자형 1에 속한다고 한 *S. sanguis* 균주 10558과 M5는 본 실험에서도 알칼린 포스퍼타제 양성균주로 판명되었고, 알칼린 포스퍼타제 비생산균주이고 유전자형 2에 속하는 균주 MPC1, 804, HPC1 및 10556은 저자의 실험에서 이 효소 생산능이 없는 것으로 관찰되어 본 실험성적이 Coykendall과 Specht⁸⁾의 것과 일치하였다.

이하선타액에 의한 세균응괴능에서는 유전자형 1에 속하는 2균주(*S. sanguis* 10558과 M5)가 양성을 보였고 유전자형 2에 속하는 4균주(*S. sanguis* MPC1, 804, HPC1, 10556)도 양성을 보였다. 이 관찰에 의하면 유전자형 1은 알칼린 포스퍼타제 생산능과 세균응괴능 모두에서 양성이 되고 유전자형 2는 알칼린 포스퍼타제 생산능 음성, 세균응괴능 양성이 되어 이 두 검사로써 두 유전자형을 용이하게 분간할 수도 있는 가능성을 시사하였다. 위에 기술한 유전자형 2의 경우는, Handley 등¹⁴⁾에 의하면 알칼린 포스퍼타제 생산능이 없으므로 세균응괴능도 소유치 않는 것인데 본 실험에서는 응괴능이 있는 것으로 관찰되었다(표 5). 이 차이가 어디에 기인 하는지 분명치 않지만 몇가지 측면으로 생각할 수 있을 것이다. 첫째, 이하선타액 성분이 다른지역에 거주하는 사람에 따라 차이가 있을 수 있는 가능성이고 또는 같은 지역 사람이더라도 타액 공여자에 따라서 이하선타액 자체에 차이가 있을 수 있는 점이다. 지역에 따라 차이가 나는 구강 생태계 구성성원의 하나는 *Streptococcus mutans*로서, 세계적으로 가장 빈번히 검출되는 혈청형은 c형이지만 이집트에서는 b형이 가장 많이 검출되는 혈청형이다. Wyatt과 Handley²⁰⁾의 경우처럼 본 실험에서는 한 사람에서 얻은 타액을 사용하여 모든 성적을 얻었으나 실험 후기에는 세 사람의 타액을 각각 사용하여 세균응괴실험을 점검하였는데 3개의 상이한 타액의 사용으로도 동일한 성적을 얻을 수 있었다.

*S. sanguis*의 알칼린 포스퍼타제의 생산에서 균주에 따라 차이가 다양하다는 것은 이 세균종이 잡다한 군의 균주로 구성된다는 다른 연구자의 보고를 지지하는 것이다. Coykendall과 Specht⁸⁾는 *S. sanguis* 균주들의 DNA 염기서열 동질성의 연구에서 *S. sanguis*를 3군의 유전자형으로 구분할 수가 있었고 그 중의 한 군은 *S. sanguis*라고 지칭하기 힘들다고 보고하였다.

Rudney와 Soberay¹⁸⁾는 최근에 *S. sanguis*의

분류에 제한효소를 이용하여 DNA fingerprinting을 시행하여 여러 균주들을 분류학적 framework로의 유형화를 기도하였다. 이 방법에 따르면 Coykendall과 Specht⁸⁾의 *S. sanguis* 유전자형 1에서도 다양성이 검출되었다. *S. sanguis* 균주들 간에 알칼린 포스퍼타제의 경우처럼 표현형에서 다양성이 보이는 것은 유전형적인 다양성에 기인하는 것 같다. 본 실험에서 *S. sanguis* 실험실 균주 10557은 분리균주 47(2)와 함께 강한 알칼린 포스퍼타제 생산주이면서도 세균응괴를 일으키지 아니 하였고 실험실 균주 9811은 이 효소를 생산치 않으며 응괴도 일으키지 아니하였다. 이 두 실험실균주는 Coykendall과 Specht⁸⁾의 연구에서, *S. sanguis*로 지칭할 수 없는 군에 속하는 것이다. 균주 10557은 PZ-peptidase의 생산²⁾과 기타 여러 생리학적 성상에서 다른 균주들과는 판이하게 행동하는 것으로 보고되어 왔다^{5,16)}. 균주 10557과 9811이 세균응괴능이 없는 것으로 보아 지금까지 *S. sanguis*로 분류되어 왔으나 최근에 *S. sanguis*에서 배제되는 것이 바람직하다고 지칭된 *S. sanguis*군을 분류하는데 이하선타액의 세균응괴검사는 유용하게 이용될 수 있을 것 같다. 침강속도는 응괴크기를 측정하는데 이용되고 있다⁹⁾. 침강과 관련하여 Stoke's Law는 침강을 입자의 밀도와 연관시키는 것이지만 본 실험에서는 위상차 현미경으로 응괴의 크기를 관찰하여 빠른 침강을 보이는 세균의 응괴는 크기가 큰 것임을 확인 할 수 있었다.

파괴치 않은 전균을 효소측정에 사용할 때는 체표에 존재하거나 체표로 유리되는 효소 활성이 측정되는 것이고 파괴한 세포의 사용에서는 세포속에 존재하는 효소 활성도 측정되어 검출되는 것이다. 전균 사용시 효소의 활성이 높거나, 낮거나, 또는 없었던 균주들은 파괴된 세포에서도 각각 고수준, 저수준을 보이거나 활성이 없었다. 이 성적은 알칼린 포스퍼타제의 측정에는 전균을 사용하여도 정확하게 균주들의 효소생산 여부를 검정할 수 있음을 보여 주는 것이다. 구강의 다른 streptococci인 *S. mutans*에서는 알칼린 포스퍼타제가 세포막 안쪽에 위치한다고 보고되었고, 전균의 이용에서 효소검출이 가능하였던 것은, *S. sanguis*에서 처럼, 이 효소가 체표로 분비되어 나오기 때문이라고 생각된다.

본 실험에서는 *S. sanguis*의 유형화에 이용하는 두 성상인 알칼린 포스퍼타제의 생산과 이

이하선타액에 의한 세균응괴를 *S. sanguis* 균주들에서 조사하였는데 본인이 얻은 성적은 다른 연구자의 것과 일치하지 않았다. 이 차이의 원인은 앞으로 구명되어야 할 과제이다.

결 론

*S. sanguis*는 표현형과 유전형에서 심한 다양성을 보이기 때문에 균주들을 분류체계 속에 나열하기가 어려운 편이다. 근래에 이 세균의 표현형의 두 정상인 알칼린 포스퍼타제의 생산 여부와 이하선 타액에 의한 세균의 응괴능의 유무에서, 어떤 *S. sanguis* 균주들 간에서 일치하였다는 보고 즉 알칼린 포스퍼타제 양성이면 세균응괴도 양성이고 알칼린 포스퍼타제 음성이면 세균응괴도 음성이라는데 근거하여 치태에서 분리하여 본 교실에서 사용하던 *S. sanguis* 균주와 실험실 보관 균주를 대상으로 상기한 두 검사를 시행하여 두 정상 사이에 연관성이 있는지를 연구하였다. 연구에서 얻은 성적은 다음과 같다.

이하선타액에 의한 세균의 응괴에서는 세균 균주에 따라 특징적인 응괴 입자의 침강 패턴을 보였다. 알칼린 포스퍼타제의 생산에 있어서는 효소 생산량의 차이와 생산 유무에 기초하여 3군 즉 다량 생산 균주, 소량 생산 균주, 그리고 비생산균주의 3군으로 대별할 수 있었다. 전균을 알칼린 포스퍼타제의 효소원으로 사용할 때 효소활성이 검출되지 않은 균주에서는, 파괴된 세균을 사용하여도 효소활성을 검출할 수 없었다. Coykendall의 제 1군의 균주는 이하선 타액으로 응괴 되었고 제 3군의 균주도 응괴되었다. Coykendall의 제 3군의 균주는 Handley의 연구에 의하면 알칼린 포스퍼타제의 생산과 이하선타액에 의한 응괴에서 각각 “++” 또는 “--” 패턴을 보인다고 하였으나 본 연구에서는 그 패턴이 “-+”로 나타났다. Coykendall의 제 2군에 속하는 실험실균주 10557과 9811은 알칼린 포스퍼타제 생산은 각각 양성 및 음성이었고 이하선타액 응괴는 두 균주 모두 음성이었다.

참 고 문 헌

- 1) 송요한, 최선진: 구강 streptococci의 적혈구 응집, 타액유도응집 및 하이드록시아파타이트에의 부착에 관한 연구. 대한구강생물학회지, 10:107-115, 1986.
- 2) 최선진: 스트렙토코카스 생귀스와 여타 구강세균이 생산하는 피젯-펩티데이즈 활성. 한국미생물학회지, 21:143-148, 1983.
- 3) Carlsson J: A numerical taxonomic study of human oral streptococci. *Odontologisk Revy* 19:137-160, 1968.
- 4) Carlsson J: Zooglea-forming streptococci, resembling *Streptococcus sanguis*, isolated from dental plaque in man. *Odontologisk Revy* 16:348-358, 1965.
- 5) Cole JS and Kolstad RA: Some atypical features of *Streptococcus sanguis* ATCC 10557. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24:370-372, 1974.
- 6) Colman G and Williams REO: Taxonomy of some human viridans streptococci. *American J. Digestive Disease*, edited by L.W. Wannamaker and J.M. Matsen. p. 282-299. Academic press, New York, 1972.
- 7) Coykendall AL and Gustafson KB: Taxonomy of *Streptococcus mutans*. p. 21-28. Hamada S, Michalek SM, Kiyono H, Menaker L and McGhee JR. *Molecular microbiology and immunobiology of Streptococcus mutans*. Elsevier science publishers, New York, 1986.
- 8) Coykendall AL and Specht PA: DNA base sequence homologies among strains of *Streptococcus sanguis*. *J. Gen. Microbiol.* 91:92-98, 1975.
- 9) Ericson T, Pruitt K and Wedel H: The reaction of salivary substances with bacteria. *J. Oral Pathol.* 4:307-323, 1975.
- 10) Facklam RR: Physiological differentiation of viridans streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 5:184-201, 1977.
- 11) Gilmour MN, Whittam TS, Kilian M and Selander RK: Genetic relationship among the oral streptococci. *J. Bacteriol.* 169:5247-5257, 1987.
- 12) Greenman J, Melville TH and Appleton J: The localization of phosphatase activity in two oral strains of *Streptococcus*. *Arch. Oral Biol.* 25:759-765, 1980.
- 13) Greenman J and Melville TH: Phosphatase activity in strains of *Streptococcus mutans*.

- Arch. Oral Biol.* **23**:965-970, 1978.
- 14) Handley PS, Carter PL, Wyatt JE and Hesketh LM: Surface structures(peritrichous fibrils and tufts of fibrils) found on *Streptococcus sanguis* strains may be related to their ability to coaggregate with other oral genera. *Infect. Immun.* **47**:217-227, 1985.
 - 15) Hardie JM and Bowden GH: Physiological classification of oral viridans streptococci. *J. Dent. Res.* **55**(spec. issue A):166-176, 1976.
 - 16) Hardie JM: Studies on *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*, Ph. D. thesis, University of London, 1975.
 - 17) Rosan B: Antigens of *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.* **7**:205-211, 1973.
 - 18) Rudney JD and Soberay AH: Restriction endonuclease classification of *Streptococcus sanguis*. *J. Dent. Res.* **68**(special issue): Abst. No. 500, 1989.
 - 19) White JC and Niven CF: Streptococcus S.B. E.: a streptococcus associated with subacute bacterial endocarditis. *J. Bacteriol.* **51**:717-722, 1946.
 - 20) Wyatt JE and Handley PS: Aggregation of *Streptococcus sanguis* biotype I and II by parotid saliva: a comparison between peritrichously fibrillar and tufted strains. *Microbios* **51**:113-123, 1987.
-