

*Porphyromonas gingivalis*가 일부 구강미생물의 형광 발현에 미치는 영향

김세연^{1,2}, 우동협¹, 이민아¹, 김지수^{1,2}, 이정하^{1,2}, 정승화^{1,2}

¹부산대학교 치의학전문대학원 예방과사회치학교실, ²부산대학교 치의학전문대학원 BK21플러스 사업단

Red fluorescence of oral bacteria interacting with *Porphyromonas gingivalis*

Se-Yeon Kim^{1,2}, Dong-Hyeob Woo¹, Min-Ah Lee¹, Ji-Soo Kim^{1,2}, Jung-Ha Lee^{1,2}, Seung-Hwa Jeong^{1,2}

¹Department of Preventive and Community Dentistry, School of Dentistry, Pusan National University,

²BK21 PLUS Project, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan, Korea

Received: December 16, 2016

Revised: January 16, 2017

Accepted: January 26, 2017

Corresponding Author: Seung-Hwa Jeong

Department of Preventive and Community Dentistry, Pusan National University School of Dentistry, Busandaehak-ro 49, Meulgeum-up, Yangsan 501612, Korea
Tel: +82-51-510-8220
Fax: +82-51-510-8221

E-mail: jsh0917@pusan.ac.kr

*This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (2014R1A1A1005924).

Objectives: Dental plaque is composed of 700 bacterial species. It is known that some oral microorganisms produce porphyrin, and thus, they emit red fluorescence when illuminated with blue light at a specific wavelength of <410 nm. *Porphyromonas gingivalis* belongs to the genus *Porphyromonas*, which is characterized by the production of porphyrin. The aim of this study was to evaluate red fluorescence emission of some oral microorganisms interacting with *P. gingivalis*.

Methods: Five bacterial strains (*P. gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces naeslundii*, and *Fusobacterium nucleatum*) were used for this study. Tryptic soy agar medium supplemented with hemin, vitamin K3, and sheep blood was used as a growth medium. The fluorescence emission of bacterial colonies was evaluated under 405 nm-wavelength blue light using a Quantitative Light-induced Fluorescence Digital (QLF-D) camera system. Each bacterium was cultured alone and co-cultured in close proximity with *P. gingivalis*. The red/green (R/G) ratio of fluorescence image was calculated and the differences of R/G ratio according to each growth condition were compared using the Mann-Whitney test ($P < 0.05$).

Results: Single cultured *S. mutans*, *L. casei* and *A. naeslundii* colonies emitted red fluorescence (R/G ratio = 2.15 ± 0.06 , 4.31 ± 0.17 , 5.52 ± 1.29 , respectively). *Fusobacterium nucleatum* colonies emitted green fluorescence (R/G ratio = 1.36 ± 0.06). The R/G ratios of *A. naeslundii* and *F. nucleatum* were increased when *P. gingivalis* was co-cultured with each bacterium ($P < 0.05$). In contrast, the R/G ratios of *S. mutans* and *L. casei* were decreased when *P. gingivalis* was co-cultured with each bacterium ($P = 0.002$, 0.003).

Conclusions: This study confirmed that *P. gingivalis* could affect the red fluorescence of other oral bacteria under 405 nm-wavelength blue light. Our findings concluded that *P. gingivalis* has an important role for red fluorescence emission of dental biofilm.

Key Words: *Actinomyces naeslundii*, Fluorescence, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus casei*, *Porphyromonas gingivalis*, Red fluorescence, *Streptococcus mutans*

서 론

치면세균막이란 치아 표면에 부착된 당단백질(glycoprotein) 성분의 얇은 막에 세균들이 부착하여 형성되는 점착성 세균덩어리의 막을 말한다¹⁾. 치면세균막을 구성하는 세균은 현재 약 700여종 이상으로 보고되고 있으며²⁾, 초기 부착에 관여하는 세균은 *mutans streptococci*, *Lactobacilli*, *Actinomycetes* 등의 그람 양성균이 있고, 후기 부착에 관여하는 세균은 *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* 등의 그람 음성균이 치면세균막 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁾. 치면세균막이 장기간 침착되면 양대 구강병인 치아우식증이나 치주질환 발생 위험이 증가하고, 이는 치면세균막의 세균의 양과 비례 한다⁴⁾.

구강 내에서 오래된 치면세균막은 특정 파장 영역의 푸른색 가시광선을 통해 붉은 색 형광으로 탐지가 가능하고, 오래된 치면세균막 일수록 붉은 색 형광이 강해진다⁵⁾. 구강 내에서 붉은 색 형광 발현의 원인은 미생물의 대사산물인 포피린(porphyrin) 화합물에 의한 것으로^{6,7)}, 포피린 구조는 탄소 원자 간의 11쌍의 이중결합과 단일결합이 존재하는 공액계(conjugated system) 구조이다⁸⁾. 자연계에 존재하는 대부분의 유기형광물질은 공액계 구조이며⁹⁾, 이 특징적인 구조로 인해 포피린은 형광 특성을 나타낸다. 형광(fluorescence)은 분자가 빛, 엑스선, 전자선 따위의 단파장의 강한 에너지 자극을 받았을 때, 분자 내 전자의 에너지 준위가 들뜬다가 다시 이완(방출)되면서 장파장의 빛을 발광하는 현상을 말한다. 물질의 분자구조가 복잡하고 공액계구조가 많을수록 원자 간 공명(resonance)현상이 발생하게 되고, 이러한 공명구조는 물질의 형광발현의 원인 중 하나로 알려져 있다^{10,11)}.

배양배지 조건과 구강 내 미생물 종류에 따라 붉은 색 형광뿐만 아니라 다양한 형광발현에 대한 연구가 수행된 바 있다. Lennon 등¹²⁾은 구강 미생물의 형광을 R/G 값으로 산출하여, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococci* (*Streptococcus sorbrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*)는 녹색 계열의 형광, *Lactobacilli* (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentans*)는 주황색 계열의 형광, *actinomycetes*, *Prevotella intermedia*가 붉은 색 계열의 형광을 발현하는 것을 막대그래프로 표현하였다. metal-free porphyrin에서 붉은 색 형광을 강하게 낸다고 하였으며, 초기부착균에 비해 후기부착 그람 음성 혐기성 균이 짙은 붉은 색이나 다홍색의 형광을 발현한다고 보고하였다^{13,14)}.

배양조건에 따라 인접배양 된 부분의 붉은 색 형광 발현에 대한 보고가 있다^{13,15)}. 한 연구에서 *Porphyromonas gingivalis*와 *Parvimonas micra* (*Peptostreptococcus micros*, *P. micros*)가 인접하게 배양되었을 때 *Parvimonas micra*가 붉은 색 형광 발현을 하였다^{13,15)}. 이러한 결과를 통해 *Porphyromonas gingivalis*의 대사작용으로 인해 인접 구강미생물의 형광 발현에 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

혈액과 헤민(hemin) 성분은 *Porphyromonas gingivalis*의 실험실 배양을 위한 필수영양성분으로, 헤모글로빈과 헤민은 철을

포함하는 포피린 구조를 가진다. *Porphyromonas gingivalis*의 배양 환경은 포피린 생성에 영향을 미친다고 알려져 있다¹⁶⁾. 단독배양으로 *Porphyromonas gingivalis*가 형광 발현을 하지 않지만 복합배양에서 인접균이 붉은 색 형광 발현 하는 것을 보아, *Porphyromonas gingivalis*는 치면세균막의 붉은 색 형광 발현에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 예상된다.

따라서 본 연구의 목적은 *Porphyromonas gingivalis*가 치면세균막을 구성하는 구강 내 일부 세균의 형광 발현에 미치는 영향을 알아보는 것이다. 본 연구의 영가설은 '*Porphyromonas gingivalis*는 구강 내 일부 세균의 형광 발현과 관련이 없다'이다.

연구재료 및 방법

1. 실험균주 선정 및 배양

본 연구 실험에 사용된 균주는 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, 이하 'KCTC')에서 분양 받은 그람양성균 *Streptococcus mutans* KCTC 3065 (이하 '*S. mutans*'), *Lactobacillus casei* KCTC 3109 (이하 '*L. casei*'), *Actinomyces naeslundii* KCTC 5525 (이하 '*A. naeslundii*'), 그람 음성균 *Fusobacterium nucleatum* KCTC 2640 (이하 '*F. nucleatum*'), *Porphyromonas gingivalis* KCTC 5352 (이하 '*P. gingivalis*') 총 5종이다(Table 1).

한국생명공학연구원 미생물자원센터에서 추천하는 배지로 *S. mutans*는 Brain Heart Infusion (Bacto™ BHI, BD, New Jersey, USA), *L. casei*는 Lactobacilli MRS (Difco MRS, BD, New Jersey, USA), *F. nucleatum*은 Scahedler (BBL™ Schaedler, BD, New Jersey, USA), *A. naeslundii*와 *P. gingivalis*는 혈액을 첨가한 Tryptic Soybean-Casein Digest Medium (Bacto™ Tryptic Soy Broth, BD, New Jersey, USA)을 사용하여 활성시켰다. 분양 받은 균주는 동결건조 상태로 앰플에 보관되어 있었으며, 300-400 µl의 각각 준비된 액체배지에 현탁하여 고체배지에서 2-7일 동안 균주의 집락이 육안으로 확인 될 때까지 배양하였다. 활성 확인 후 균주의 콜로니(colony)를 20% glycerol 500 µl에 넣어 초저온 냉동고(-76°C)에서 동결 보존하였다.

단일배양과 복합배양에 사용한 배지는 선행연구들을 참고하여 혈액(Blood)을 첨가한 Tryptic Soy Agar (이하 'TSAB')를 사용하였다¹³⁾. 실험을 시작하기 전, 동결 보존된 균주의 활성을 위해 초저온 냉동고에서 꺼낸 후 실온에서 액체 상태로 녹인 뒤, 최고의

Table 1. Bacterial strains and culture requirement

Strains	Straining properties	Culture requirement
<i>Streptococcus mutans</i>	Gram positive	Facultative anaerobes
<i>Lactobacillus casei</i>	Gram positive	Facultative anaerobes
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Gram positive	Anaerobes
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Gram negative	Anaerobes
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Gram negative	Anaerobes

활성 상태를 유도하여 실험에 사용하였으며, 균주들은 37°C에서 혐기성 배양 조건을 유지하며 2-7일 동안 균주의 집락이 육안으로 확인 될 때까지 배양하여 본 실험에 사용하였다.

단일균주의 배양을 위해 TSAB 배지에 전 배양된 균을 선행으로 그었고, 집락이 육안으로 확인 될 때까지 2-7일간 혐기성 배양기(anaerobic chamber, Coy Lab., Michigan, USA)에서 배양하였다. 복합배양을 위해 두 가지 균주를 한 고체배지에서 배양하였으며, 2번 반복실험 하였다. 배양 방법은 van der Veen 등¹³⁾의 방법을 본 실험에 적합하도록 수정하여 사용하였다. 고체배지에서 콜로니로 전 배양된 균 중 *P. gingivalis*를 먼저 TSAB 배지에 세로로 도말하였고, 세로로 도말된 *P. gingivalis* 위에 *S. mutans*, *L. casei*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*을 가로로 도말하였다. 도말이 완료된 TSAB 배지는 7일간 혐기성 배양기(anaerobic chamber, Coy Lab., Michigan, USA)에서 배양하였다. 단일배양과 복합배양은 각 2회 반복 실험하였다.

2. 실험균주의 형광평가

실험 균주의 형광 평가를 위해 Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (이하 'QLF-D') 시스템(QLF-D Biluminator 2, Inspektor Research systems BV, Amsterdam, The Netherlands)을 사용하였으며, QLF-D 시스템은 DSLR (Digital Single Lens Reflex) camera (EOS 550D, Canon, Tokyo, Japan) 본체 앞에 4개의 백색광(white light)과 12개의 청색광(blue light) LED가 장착된 405 nm 파장 영역의 푸른색 가시광선으로 박테리아 관련 대사산물의 붉은 색 형광을 탐지할 수 있는 장비이다. TSAB 배지에 배양된 단일콜로니와 복합배양의 발현 색상 평가를 위해, 촬영 조건으로 백색광은 shutter speed 1/30 s, aperture value 8.0, ISO speed 1600, 청색광은 shutter speed 1/13 s, aperture value 5.6, ISO speed 1600으로 고정하였으며, QLF-D 카메라 조작용 소프트웨어(C3 v1.25, Inspektor Research systems BV, Amsterdam, The Netherlands)를 사용하였다. 'Live view' 방식으로 어두운 방에서 7일 배양된 배양배지를 개봉한 뒤, 광원 튜브가 배양배지 바로 위에 위치하도록 일정 거리를 유지하며 촬영하였다.

3. 결과 분석

3.1. 이미지분석

Lennon 등¹²⁾의 분석방법을 참고하여 디지털의 이미지는 컴퓨터 이미지 분석 프로그램(ImageJ/FIJI 1.46, National Institute of Mental Health, USA)을 사용하여 정량화하였다. Image J 프로그램을 통해 Red, Green, Blue (RGB)값을 측정하고 평균 R/G 값을 계산하였다.

단일균주 이미지는 한 배양배지에서 5개의 콜로니를 지정하였고, 복합배양에서는 겹쳐지는 10 곳을 임의 지정하여 RGB 값을 측정하여 평균 R/G 값을 계산하여 분석하였다.

3.2. 통계분석

통계 분석은 IBM SPSS® 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 정규성 분포를 확인한 뒤, 단일배양 균주의 평균 R/G 값과 복합배양 평균 R/G 값의 차이를 Mann-Whitney 검정을 통해 비교하였으며, 유의수준은 5%로 설정하였다.

연구성적

1. 단일배양 결과

7일 동안 37°C 혐기성 배양기에서 배양된 후, *P. gingivalis*를 제외한 모든 균이 405 nm 청색광에서 형광을 확인할 수 있었다. *S. mutans*, *L. casei*, *A. naeslundii*는 붉은 색 계열의 형광을 발현하였으며, *F. nucleatum*은 녹색 계열의 형광을 발현하였다(Fig. 1).

2. 복합배양 결과

S. mutans, *L. casei*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*과 *P. gingivalis*를 복합배양 한 결과는 다음과 같다(Fig. 1).

단일배양에서 R/G 값이 2.15 ± 0.06 으로 붉은 색 계열의 형광을 발현 하였던 *S. mutans*는 *P. gingivalis*와 복합배양에서 R/G 값이 1.73 ± 0.07 으로 감소되었고 붉은 색 계열의 형광이 소실되었다. 단일배양에서 R/G 값이 4.31 ± 0.17 으로 붉은 색 계열의 형광을 발현하였던 *L. casei*는 *P. gingivalis*와 복합배양에서 R/G 값이 3.40 ± 0.58 으로 감소되었지만 붉은 색 계열의 형광을 발현하였다. 단일균주 배양에서 R/G 값이 5.52 ± 1.29 으로 붉은 색 계열의 형광을 발현 하였던 *A. naeslundii*는 *P. gingivalis*와 복합배양에서 R/G 값이 7.59 ± 1.95 으로 증가하였고 붉은 색 계열의 형광을 발현 하였다. 단일배양에서 R/G 값이 1.36 ± 0.06 으로 녹색 계열의 형광을 발현하였던 *F. nucleatum*은 *P. gingivalis*와 복합배양에서 R/G 값이 2.61 ± 0.33 으로 R/G 값이 증가하여 붉은 색 계열의 형광을 발현하였다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Red fluorescence assessment of oral bacteria grown in single- and co-culture

Culture status	Mean \pm SD*	Red fluorescence	P
<i>S. mutans</i>	2.15 ± 0.06	+	0.002
<i>S. mutans</i> + <i>P. gingivalis</i>	1.73 ± 0.07	-	
<i>L. casei</i>	4.31 ± 0.17	+	0.003
<i>L. casei</i> + <i>P. gingivalis</i>	3.40 ± 0.58	+	
<i>A. naeslundii</i>	5.52 ± 1.29	+	0.020
<i>A. naeslundii</i> + <i>P. gingivalis</i>	7.59 ± 1.95	+	
<i>F. nucleatum</i>	1.36 ± 0.06	-	0.002
<i>F. nucleatum</i> + <i>P. gingivalis</i>	2.61 ± 0.33	+	

*: mean R/G value with standard deviation.

+: The emission of red fluorescence was detected.

-: The emission of red fluorescence was not detected.

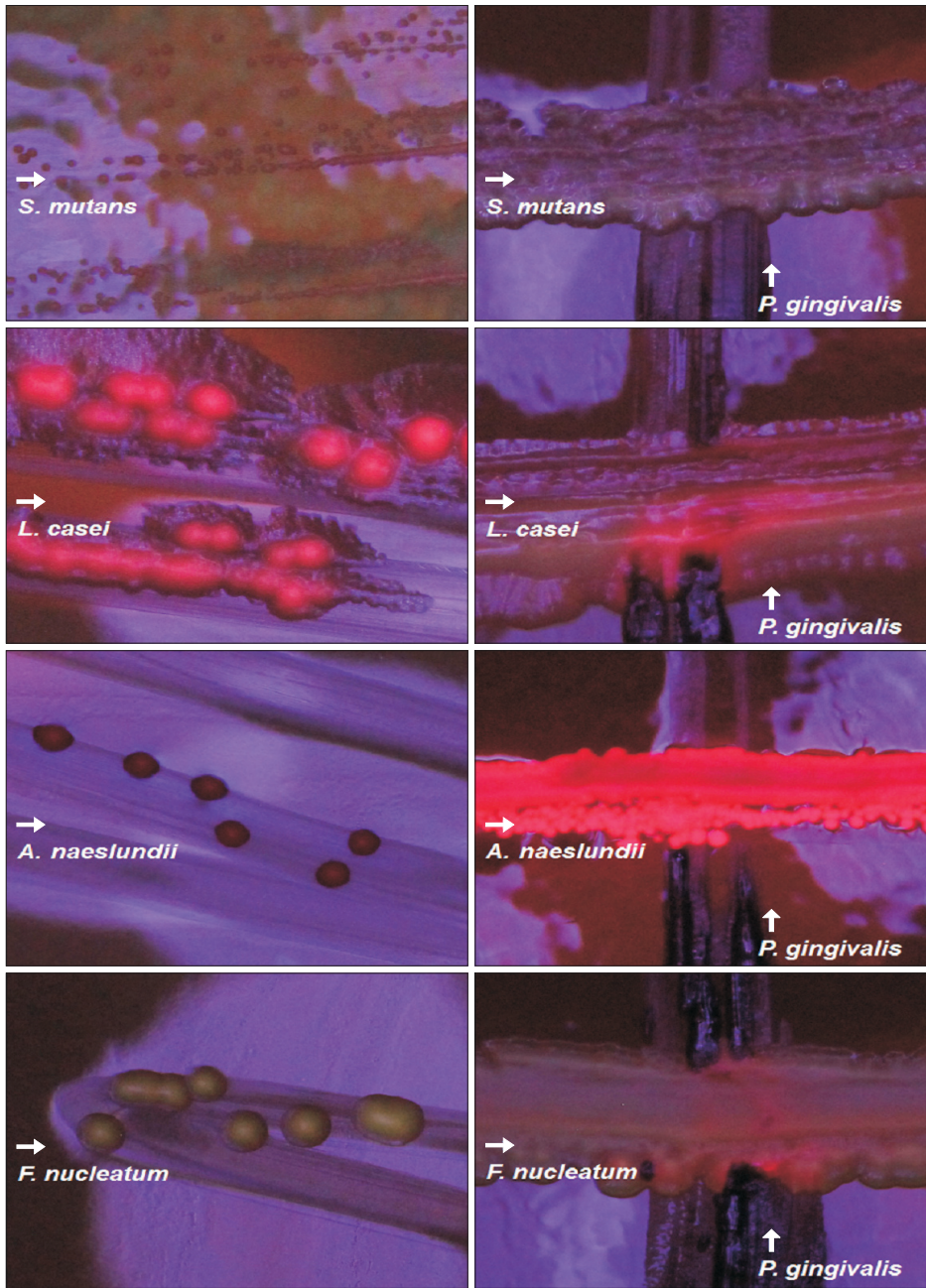


Fig. 1. The blue-light image of *S. mutans*, *L. casei*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum* cultivated on TSA blood media. Fluorescence images of left side were cultivated single at each plate, right side were cultivated in close proximity with *P. gingivalis*.

고 안

구강 내에는 다양한 미생물이 서로 상호작용 하며 구강 내에 상주하고 있고^{17,18)}, 구강 내 모든 미생물의 종류를 파악하기 위해서 유전자 분석과 같은 방법은 많은 시간과 비용이 요구된다. 최근 구강 내 오래된 치면세균막을 특정 파장 영역의 푸른색 가시광선을 통해 붉은 색 형광으로 탐지가 가능하고¹⁹⁾, 이 형광은 미생물의 대사산물인 포피린(porphyrin) 화합물에 의한 것으로 알려져 있다⁶⁻⁸⁾. 이에 구강 내 치면세균막 구성 균주 중 형광 발현을 하는 균주를 파악하는 실험실상 연구가 필요하다고 사료되었다. 구강 내에 존재하는 미생물 중 형광발현 균주를 평가하고 구강 내 미생물간 상호작용을 통해 형광 발현에 영향을 미치는지를 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 다양한 배지 중 Volgenant 등¹³⁾의 연구에서 사용한 vitamin K와 헤민, 혈액을 첨가한 Tryptic Soy Agar를 사용하였고, van der Veen 등¹⁵⁾의 연구에서도 혈액이 첨가된 배지를 사용하였을 때 미생물의 붉은 색 형광이 강하게 발현한다고 보고하였다. 본 연구에서 단일배양 결과는 Volgenant 등¹³⁾의 405 nm 파장 영역에서 단일균주의 형광 발현 색상과 모두 동일하게 나타났다. 하지만, Lennon 등¹²⁾의 연구에서의 결과와 본연구의 단일배양 결과는 다른 점이 존재하였다. 선행 연구에서는 *S. mutans*의 형광발현 색상이 R/G 값이 0.91로 녹색 계열 형광을 발현하였지만, 본 연구에서 R/G 값이 2.15로 붉은 색 계열 형광을 발현하였다.

이와 같은 결과는 동일한 *S. mutans*이지만 배지성분에 따라 형광 발현이 차이가 있음을 알 수 있었다. Lennon 등¹²⁾의 연구에서는 vitamin K와 헤민이 첨가된 Columbia agar를 사용하였다.

*P. micros*는 단일배양에서 형광을 발현하지 않았지만 *P. gingivalis*와 인접하게 교차 배양되었을 때, *P. micros*와 *P. gingivalis*가 교차하는 부분에서 붉은 색 형광을 발현한다¹⁵⁾. 본 연구에서도 *P. gingivalis*가 치면세균막을 구성하는 일부 구강미생물과 인접하게 복합배양 되었을 때의 형광 발현을 관찰하였다. *P. gingivalis*는 대사작용 중 포피린을 생산한다는 점에서 *Porphyromonas* 속으로 분류되었고, 강한 적혈구 응집력과 강한 부착력을 가지고 있다²⁰⁾. 따라서 *P. gingivalis*가 생산한 포피린에 의해 치면세균막을 구성하는 구강 내 일부 균주의 형광에 변화가 있는 것이라고 사료된다. 혈액과 헤민(hemin) 성분이 *P. gingivalis*의 실험실 배양을 위한 필수영양성분으로 알려져 있고, 이러한 배양 환경은 포피린 생성에 영향을 미친다고 알려져 있다^{13,16)}.

구강 내에서 치면세균막을 구성하는 일부 균주 중 *A. naeslundii*와 *F. nucleatum*은 *P. gingivalis*와 복합배양 하였을 때 R/G 값이 증가하였다. 선행 연구¹³⁾에서는 *A. naeslundii*가 분광분석 결과 붉은 색 자가 형광 발현을 하였고, 복합배양에서 발현 파장 값(634 nm)이 단일배양에서 발현 파장 값(620 nm) 보다 증가하였지만, *F. nucleatum*은 이전 연구와 상반된 결과를 나타냈다. 이러한 차이는 복합배양 방법을 달리 하였기 때문이라고 생각된다. 선행 연구에서는 한 배양배지 안에서 두 가지 균을 혼합하여 배양하였기 때문에 각 균주들의 성장 시간이 배제된 것으로 사료된다. 단일배양 시간을 고려하면 *P. gingivalis*는 2-3일 성장시간이 느리다. 본 연구의 복합배양에서는 van der Veen 등¹⁵⁾의 연구방법을 참고하여 배양 공간을 확보 하였다.

반면에, Volgenant 등¹³⁾의 연구에서 *S. mutans*는 *P. gingivalis*와 복합배양한 결과, 붉은 색 형광 발현을 하였으나 본 연구의 경우 *S. mutans*는 *P. gingivalis*와 복합배양에서 형광이 소실되었다. *L. casei*의 경우도 R/G 값이 감소하였다. 현재, *P. gingivalis*와 복합배양에서 붉은 색 형광이 소실되거나 감소되었다는 보고는 없다. 일부 균주가 *P. gingivalis*와 복합배양 되었을 때, 붉은 색 형광이 증가 또는 감소되는 본 연구 결과를 바탕으로, *P. gingivalis*와의 복합배양 방식, 배양시간에 따른 붉은 색 형광 발현에 대해서는 계속적으로 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구의 한계점으로는 다음과 같다. QLF-D는 치아우식증, 치면세균막, 미생물의 활성, 치석, 착색 등 진료 과정에서 활용하기 좋은 장비이지만 QLF-D 광원 튜브에서의 램프들이 배양배지에 반사되어 객관적인 정량화 분석에는 한계가 존재하였다. RGB 값은 빛의 삼원색인 Red, Green, Blue 세 종류의 광원을 이용하여 색을 표현하는 방식으로 본 연구에서 B 값은 QLF-D의 청색광 원으로 배제되었지만, 세 가지 값에 따라 혼합색이 결정된다. 따라서 미세분광광도계(micro spectrophotometer)를 사용하여 발현(emission) 파장을 확인하는 방법을 추가하거나 최대한 QLF-D 광원 램프의 간섭을 받지 않도록 배지중앙부분에 콜로니를 위치시켜 정량화 분석의 한계를 극복하는 방법이 필요하다. 분석의 한계를

극복하여 추후 연구에서는 구강 내의 치면세균막을 구성하는 두 가지 이상 균주의 복합배양과 복합배양 후 미생물의 구조 변화 분석이 필요하다고 사료되었다.

결론

본 연구는 포피린을 생성하는 *Porphyromonas gingivalis*가 치면세균막을 구성하는 구강 내 일부 세균의 붉은 색 형광 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 서로 다른 4종의 균주와 복합배양한 결과는 다음과 같았다.

1. 단일균주배양 결과를 통해 *P. gingivalis*를 제외하고 *S. mutans*, *L. casei*, *A. naeslundii*는 붉은 색 계열의 형광을 발현 하였고, *F. nucleatum*은 녹색 계열의 형광을 발현 하는 것을 확인하였다.

2. 단일균주 붉은 색 형광을 발현하였던 *S. mutans*와 *L. casei*의 R/G 값은 *P. gingivalis*와 복합배양에서 감소하였다. *S. mutans*는 붉은 색 형광을 소실하였고, *L. casei*는 붉은 색 형광을 유지하였다.

3. 단일균주 붉은 색 형광을 발현하였던 *A. naeslundii*의 R/G 값은 *P. gingivalis*와 복합배양에서 증가하였다. *A. naeslundii*는 붉은 색 형광을 유지하였다.

4. 단일균주 붉은 색 형광을 발현하지 않았던 *F. nucleatum*의 R/G 값은 *P. gingivalis*와 복합배양에서 증가하였다. 단일균주 배양에서 녹색 계열의 형광 발현을 하였던 *F. nucleatum*의 경우 *P. gingivalis*와 복합배양으로 인해 붉은 색 형광 발현을 하였다.

치면세균막을 구성하는 구강 내 일부 미생물들은 배지 환경에 따라 형광 발현에 영향이 있었으며, 포피린을 합성하는 균인 *P. gingivalis*가 인접한 구강미생물의 형광 발현에 영향을 미치는 것을 확인하였다. *P. gingivalis*와 복합배양 한 균주에 따라 R/G 값이 변화하는 것으로 치면세균막 내의 다양한 균주들이 서로 상호작용하여 붉은 색 형광을 내는 것으로 여겨진다. *P. gingivalis*와 복합배양에서 붉은 색 형광이 증가 또는 감소되는 결과를 바탕으로, *P. gingivalis*와의 복합배양 방식, 배양시간에 따른 연구가 계속될 필요가 있다.

References

- Kim JB, Choi YJ, Paik DI, et al. Preventive dentistry. 4th ed. Seoul;KMS:2004: 282-287.
- Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontol 2000 2006;42:80-87.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell - cell distance. Nat Rev Microbiol 2010;8:471-480.
- Listgarten MA. The structure of dental plaque. Periodontol 2000 1994;5:52-65.
- Lee ES, Kang SM, Ko HY, Kwon HK, Kim BI. Association between the cariogenicity of a dental microcosm biofilm and its red fluorescence detected by Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D). J Dent 2013;41:1264-1270.

6. Hibst R, Paulus R. Caries detection by red excited fluorescence: investigations on fluorophores (abstract). *Caries Res* 1999;33:295.
7. Koenig K, Schneckenburger H. Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis. *J Fluoresc* 1994;4:17-40.
8. Dolowy WC, Brandes ML, Gouterman M, Parker JD, Lind J. Fluorescence of dental calculus from cats, dogs, and humans and of bacteria cultured from dental calculus. *J Vet Dent* 1995;12:105-109.
9. Fluorescence conjugation [Internet]. Wikipedia; [cited 2016 Nov]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_in_the_life_sciences.
10. Resonance [Internet]. Naver; [cited 2017 Jan]. Available from: <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=2277756&cid=42419&categoryId=42419>.
11. Resonance fluorescence [Internet]. Naver; [cited 2017 Jan]. Available from: <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1063266&ref=y&cid=40942&categoryId=32227>.
12. Lennon AM, Buchalla W, Brune L, Zimmermann O, Gross U, Attin T. The ability of selected oral microorganisms to emit red fluorescence. *Caries Res* 2006;40:2-5.
13. Volgenant CM, Van der Veen MH, de Soet JJ, ten Cate JM. Effect of metalloporphyrins on red autofluorescence from oral bacteria. *Eur J Oral Sci* 2013;121:156-161.
14. Coulthwaite L, Pretty IA, Smith PW, Higham SM, Verran J. The microbiological origin of fluorescence observed in plaque on dentures during QLF analysis. *Caries Res* 2006;40:112-116.
15. Van der Veen MH, Thomas RZ, Huysmans MC, de Soet JJ. Red autofluorescence of dental plaque bacteria. *Caries Res* 2006;40:542-545.
16. Fyrestam J, Bjurshammar N, Paulsson E, Mansouri N, Johannsen A, Östman C. Influence of Culture Conditions on Porphyrin Production in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017;17:115-123.
17. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995;15:169-175.
18. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:471-480.
19. Kim YS, Lee ES, Kwon HK, Kim BI. Monitoring the maturation process of a dental microcosm biofilm using the Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D). *J Dent* 2014;42:691-696.
20. Shah HN, Collins DM. Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 1988;38:128-131.