

성장배지 혈액 유무가 구강미생물의 적색 형광 발현에 미치는 영향

정승화^{1,2}, 양용훈¹, 이민아¹, 김세연^{1,2}, 김지수^{1,2}

¹부산대학교 치의학전문대학원 예방과사회치위학교실, ²부산대학교 치의학전문대학원 BK21플러스 사업단

Red fluorescence of oral bacteria is affected by blood in the growth medium

Seung-Hwa Jeong^{1,2}, Yong-Hoon Yang¹, Min-Ah Lee¹, Se-Yeon Kim^{1,2}, Ji-Soo Kim^{1,2}

¹Department of Preventive and Community Dentistry, ²BK21 PLUS Project, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan, Korea

Received: December 7, 2017
Revised: December 11, 2017
Accepted: December 12, 2017

Corresponding Author: Seung-Hwa Jeong
Department of Preventive and Community
Dentistry, Pusan National University
School of Dentistry, 49 Busandaehak-ro,
Meulgeum-up, Yangsan 50612, Korea
Tel: +82-51-510-8222
Fax: +82-51-510-8221
E-mail: jsh0917@pusan.ac.kr
*This work was supported by a 2-year
Research Grant of Pusan National
University.

Objectives: Dental plaque emits red fluorescence under a visible blue light near the ultra-violet end of the light spectrum. The fluorescence characteristics of each microorganism have been reported in several studies. The aim of this study was to evaluate changes in red fluorescence of oral microorganisms that is affected by blood in the culture media.

Methods: The gram-positive *Actinomyces naeslundii* (AN, KCTC 5525) and *Lactobacillus casei* (LC, KCTC 3109) and gram negative *Prevotella intermedia* (PI, KCTC 3692) that are known to emit red fluorescence were used in this study. Each bacterium was activated in broth and cultivated in different agar media at 37°C for 7 days. Tryptic soy agar with hemin and vitamin K₃ (TSA), TSA with sheep blood (TSAB), basal medium mucin (BMM) medium, and BMM with sheep blood (BMMB) were used in this study. Fluorescence due to bacterial growth was observed under 405-nm wavelength blue light using the quantitative light-induced fluorescence-digital (QLF-D) device. The red, green, and blue fluorescence values of colonies were obtained using image-analysis software and the red to green ratio (R/G value) and red to total RGB ratio (R/RGB value) were calculated for quantitative comparison.

Results: The QLF-D images of the AN, LC, and PI colonies showed red fluorescence in all media, but the fluorescence of all bacteria was reduced in TSA and BMM media, compared with in TSAB and BMMB media. Both the R/G and the R/RGB values of all bacteria were significantly reduced in growth media without blood ($P < 0.001$).

Conclusions: Based on this in vitro study, it can be concluded that red fluorescence of oral bacteria can be affected by growth components, especially blood. Blood-containing medium could be a significant factor influencing red fluorescence of oral bacteria. It can be further hypothesized that bleeding in the oral cavity can increase the red fluorescence of dental plaque.

Key Words: QLF-D, Red fluorescence, Blood, Dental plaque, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella intermedia*

서론

치면세균막은 구강 내에 존재하는 대표적인 바이오필름으로, 구강바이오필름(oral biofilm)을 구성하는 세균은 현재 약 700 여 종 이상으로 보고되고 있으며, 초기 부착에 관여하는 세균은 호기성, 그람 양성 *Streptococcus* sp., *Actinomyces* sp. 등이며, 후기부착에는 혐기성, 그람 음성의 *Fusobacteria*, *Prevotella* sp. 등이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 하지만, 실제로는 개인의 구강 환경에 따라 세균의 종류, 양, 그리고 구성 비율이 다르게 나타나며, 이는 바이오필름에 의한 구강질환 유발 가능성과 밀접한 관련이 있다. 구강 바이오필름의 특성을 파악하기 위해 real-time PCR과 같은 유전자 분석을 통해 세균의 종류와 양을 파악할 수 있으나, 이는 많은 시간과 비용이 요구되며, 실제 임상 적용에는 한계가 존재한다.

치면세균막은 푸른색 파장 영역의 빛 조건 하에서 적색 형광(red fluorescence)을 발현하며, 이는 바이오필름을 구성하는 일부 세균들이 만들어내는 metal free fluorescent porphyrins 화합물의 자가 형광 발현에 의한 것으로 알려져 있다³⁻⁵⁾. 포피린 구조는 11개의 이중결합이 단일 결합과 번갈아 있는 콘쥬게이션 이중 결합(conjugation double bond)으로 되어있고, 이 특징적인 구조로 인해 형광 특성을 나타낸다⁶⁾.

치면세균막이 성숙함에 따라 구성 세균의 조성이 통성 혐기성, 그람-양성균에서 절대 혐기성, 그람-음성균으로 변화하게 되면, 치면세균막의 적색 형광은 증가한다^{4,7,8)}. Dental microcosm biofilm 모델을 이용한 실험실 연구는 배양 기간뿐만 아니라 sucrose의 농도가 증가함에 따라 바이오필름의 적색 형광 발현이 증가함을 보고하였다^{9,10)}. 이를 통해 치면세균막의 적색 형광은 치면세균막의 초기 형성 후 오랫동안 제거되지 않고 성장했을 때 발현이 증가하는 것을 알 수 있다.

구강 세균의 종류에 따라 형광 발현의 차이가 존재한다. Lennon 등¹¹⁾은 11종의 서로 다른 구강 세균을 고체 배양했을 때 *Prevotella intermedia*, *Actinomyces naeslundii*와 *A. israelii*는 강한 적색 형광을 나타내었으며, *Lactobacillus fermentans*, *L. rhamnosus*와 *L. casei*는 오렌지색 형광이 발현함을 확인하였다. 또한 *Streptococcus oralis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. sobrinus*와 *F. nucleatum*은 녹색 형광을 발현함을 보고하였다. Coulthwaite 등⁴⁾은 구강내 의치에 부착된 세균막에서 분리된 *Prevotella melaninogenica*와 *A. israelii*는 적색 형광을 *Candida albicans*은 오렌지색 형광을, *F. nucleatum*, *Propionibacterium acnes*, *S. mitis*, *S. mutans*와 *S. salivarius*은 녹색 형광을 발현함을 보고하였다. 이들 연구에서 사용한 고체 배지 조건은 상이하지만, 일반적으로 *Actinomyces* sp.와 *Prevotella* sp. 계열의 후기 집락균들은 적색 형광을, *Fusobacteria* sp.과 *Streptococcus* sp. 계열의 초기 집락균들은 녹색 형광을 발현하는 것으로 여겨진다.

하지만, 본 연구진의 예비실험에서는 기존의 연구결과와는 다른 세균의 형광 발현 특성을 확인한 바 있으며, 각 세균의 형광 발현 특성은 각 세균의 고유의 특성뿐만 아니라, 배지 종류와 같은

주변 배양 환경에도 영향을 받아 달라질 것으로 예상된다. 따라서 본 연구의 목적은 배양 환경에 따른 구강 세균의 적색 형광 발현 변화를 실험실 상에서 확인하는 것이다. 이를 위해 적색 형광을 발현한다고 알려진 3 종의 대표적인 구강 균주를 선정하였으며, 서로 다른 배지 조성, 특히 혈액(blood) 첨가 유무에 따른 배양된 세균의 집락의 적색 형광 발현 변화를 관찰하였다. 본 연구의 연구설은 [세균의 적색 형광 발현 특성은 배지의 혈액 첨가 여부와 관련이 없다]이다.

연구대상 및 방법

1. 실험 균주 선정 및 배양

본 연구를 위해 총 3 종의 구강 균주를 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)로부터 분양받아 사용하였다. 그람-양성의 *Lactobacillus casei* KCTC 3109 (이하 *L. casei* 또는 LC)와 *Actinomyces naeslundii* KCTC 5525 (이하 *A. naeslundii* 또는 AN), 그람-음성의 *Prevotella intermedia* KCTC 3692 (이하 *P. intermedia* 또는 PI)가 본 연구에 사용되었다. 균의 활성화를 위해 각 균주를 성장 최적배지(*L. casei*: KCTC Media No. 202, *A. naeslundii*: KCTC Media No. 753, *P. intermedia*: KCTC Media No. 753)에서 37°C, 혐기성 배양기(90% N₂, 5% H₂ and 5% CO₂)에서 4일 간 배양하였다. 활성화된 균주는 최종 배양 실험 전까지 -70°C에서 20% glycerol stock 용액 상태로 보관하였다.

전 배양을 통해 활성화 된 각 균주는 4종의 서로 다른 평판 배지(TSA, TSAB, BMM, BMMB)에 선형으로 도말 한 뒤, 혐기성 배양 조건에서 37°C, 7일 간 배양하였고, 이를 다시 동일한 환경에서 계대 배양한 세균 집락을 최종 평가에 활용하였다. 이 때 사용된 각 배지의 조성은 Table 1과 같다. 모든 실험 균주는 각 배지 환경에서 3번 반복 배양되었다.

2. 실험 균주의 형광 이미지 채득

405 nm의 파장 하에서 실험 균주 집락이 나타내는 형광 특성을 평가하기 위해 Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital 시스템(QLF-D Biluminator™, Inspektor Research

Table 1. The components of growth medium used in this study

Medium type	Composition
TSA medium ¹²⁾	30.0 g tryptic soy broth, 5.0 g yeast extract, 0.5 g cysteine HCl · H ₂ O, 5 mg hemin, 1.0 mg vitamin K ₃ , 20 g agar per liter (pH 7.0)
TSAB medium	TSA medium components, 5% sheep blood
BMM medium ^{10,14)}	10.0 g proteose peptone, 5.0 g trypticase peptone, 5.0 g yeast extract, 2.5 g purified pig gastric mucin, 2.5 g KCl, 5.0 g sucrose, 60.06 mg urea, 174.2 mg arginine, 5 mg hemin, 1.0 mg vitamin K ₃ , 20 g agar per liter (pH 6.8)
BMMB medium	BMM medium components, 5% sheep blood

systems BV, Amsterdam, The Netherlands)을 이용하였다(이하 QLF-D). QLF-D는 DSLR (Digital full-sensor Single Lens Reflex) 카메라(EOS 550D, Canon, Tokyo, Japan), 매크로 렌즈(EF-S 60 mm F2.6 MACRO USM, Cannon, Tokyo, Japan), 그리고 청색광을 차단하기 위한 황색과 적색의 광학필터와 405 nm 파장의 청색광을 조사하는 blue LED와 백색광을 조사하는 white LED로 구성되어 있다. QLF-D 촬영은 암실에서 고정된 카메라 세팅(백색광 촬영 세팅: shutter speed 1/30 s; aperture value 8.0; ISO speed of 1600; 청색광 촬영 세팅: shutter speed 1/13 s; aperture value 5.6; ISO speed of 1600) 하에서 진행되었다. QLF-D 카메라 조작용 소프트웨어는 함께 제공되는 전용 프로그램(C3 v1.25, Inspector Research systems BV, Amsterdam, The Netherlands)을 이용하였다. QLF-D 촬영을 통해 얻은 디지털 이미지를 분석에 활용하였다.

3. 형광 이미지 분석

QLF-D촬영 이미지 상의 세균 집락의 형광색의 정량화를 위해 이미지 분석 프로그램(IMAGE J v1.49b; The National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하였다. 평판배지 상에 존재하는 다수의 세균 집락 중 임의로 5개를 선택하였으며, 선택된 집락 면적의 평균 R (Red), G (Green), B (Blue) 값을 산출하였다. 최종적으로 세균 집락의 적색 형광의 상대적인 발현 정도를 비교하기 위하여 R/G와 R/(R+G+B) (이하 R/RGB) 값을 도출하였다.

4. 통계 분석

동일한 배지에서 배양된 3균의 형광 발현 차이를 비교하기 위해, Kruskal-Wallis 비모수검정을 시행하였으며, 동일 배지 내 혈액의 첨가 유무에 따른 형광발현의 차이를 비교하기 위하여 Mann-Whitney 비모수 검정을 시행하였다. 유의수준은 5%로 설정하였으며, 모든 통계분석은 IBM SPSS statistics 23.0 (SPSS inc.,

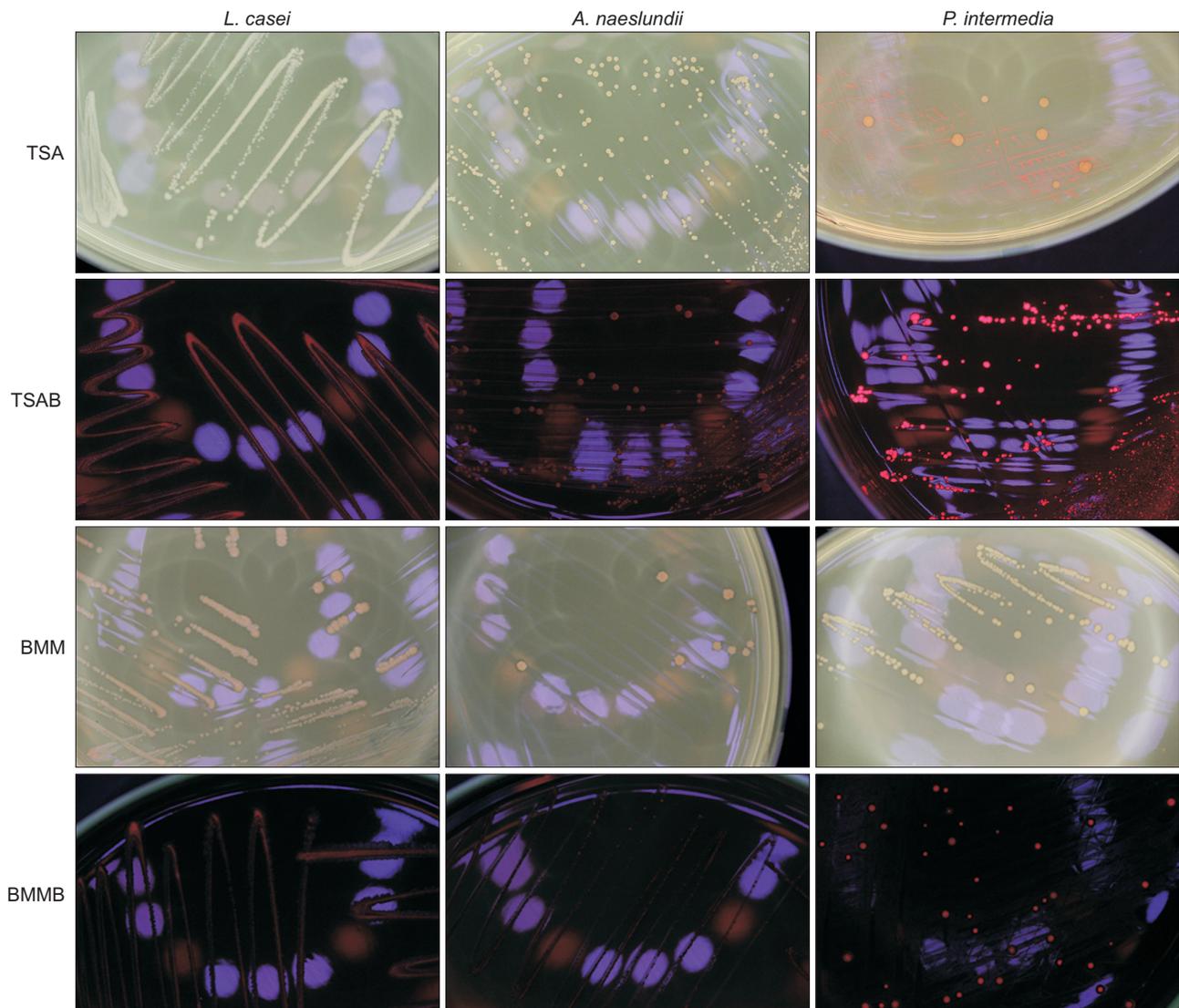


Fig. 1. QLF-D fluorescence image of *L. casei*, *A. naeslundii*, *P. intermedia* on each growth medium.

Chicago, IL, USA)을 이용하였다.

연구 성적

1. 실험 균주의 형광 발현 특성

전 배양된 세균 집락을 TSA 평판 배지에서 계대배양 후 QLF-D로 형광 특성을 육안으로 확인한 결과 LC와 AN은 밝은 녹색 계열의 형광을, PI는 주황색 계열의 형광 특성을 나타냈다. 반면, TSA 배지에 혈액이 첨가된 TSAB 평판 배지에 대해서는 LC, AN, PI 모두 적색 계열의 형광 특성을 나타냈다(Fig. 1).

BMM 평판 배지에 대해서는 LC, AN, PI 모두 밝은 녹색 계열의 형광을 나타낸 반면, BMM 배지에 혈액이 첨가된 BMMB 평판 배지에 대해서는 LC, AN, PI 모두 적색 계열의 형광 특성을 나타냈다(Fig. 1).

2. 적색 형광(Red Fluorescence) 분석

QLF-D 이미지 상의 각 세균 집락의 적색 형광의 비율을 정량화하기 위하여 R/G, R/RGB 값을 산출하였다(Table 2). TSA에 대한 LC, AN, PI 집락의 R/G값은 각각 0.97, 1.10, 1.35로 나타났지만, TSAB에 대해서는 8.67, 6.98, 6.73으로 높게 나타났다($P < 0.001$). 또한 BMM에 대한 각 균의 R/G 값은 1.15, 1.26, 1.01로 나타났지만, BMMB에 대해서는 7.87, 4.49, 45.84로 높게 나타났다($P < 0.001$).

한편, TSA에 대한 LC, AN, PI 집락의 R/RGB 값은 각각 0.34, 0.38, 0.44로 나타났지만, TSAB에 대해서는 0.73, 0.74, 0.66으로 높게 나타났다($P < 0.001$). 또한 BMM에 대한 각 균의 R/RGB 값은 0.38, 0.41, 0.36으로 나타났지만, BMMB에 대해서는 0.69, 0.66, 0.89로 높게 나타났다($P < 0.001$).

고 안

세균 집락의 적색 형광 발현에 관한 기존의 선행 연구들은 혈액, 비타민 K, 헤민(hemin) 성분이 단독 또는 동시 함유된 배지를 사용함으로써^{4,8,11,12}, 세균에 의한 포피린 대사를 유도하고 형광 발현 유무를 관찰하였다. 이러한 선행 연구들은 특정 세균의 적색 형

광 발현 여부에 주로 관심이 있었다. 본 연구에서는 적색 형광을 발현한다고 알려진 균주에 대하여 배지 성분에서 혈액의 유무가 세균 집락의 적색 형광 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

405 nm의 푸른 빛 파장 하에서 일부 구강 세균 집락은 형광 발현 특성 나타내며, 균 종류에 따라 발현하는 형광색은 녹색, 오렌지색, 적색 등 서로 다르다고 보고된 바 있다^{4,11}. 특히 적색 형광 원인은 일부 세균의 대사 산물인 포피린 화합물에 의한 것으로 알려져 있다⁵. 포피린 구조는 4개의 피롤이 4개의 메텐(-CH₂-)으로 연결된 다중환(macrocylic) 구조로써, 헤모글로빈을 구성하는 헴(헤민)과 엽록소는 포피린 구조 중심에 각각 2개의 철(Fe)과 마그네슘(Mg) 금속 이온을 배위하고 있는 대표적인 금속 포피린(Metalloporphyrin)이다¹³.

본 연구에서는 구강 세균의 형광 발현에 관한 선행 연구에서 사용된 비타민 K와 헤민이 첨가된 Tryptic soy agar (TSA) 배지¹²와 치면세균막 미세생태계 바이오필름(in vitro dental plaque microcosm biofilm) 모델에서 사용된 basal medium mucin (BMM) 배지^{10,14}를 사용하였다. 두 배지 모두 비타민 K와 헤민을 공통으로 함유하고 있으며, 이 두 성분은 일부 구강세균의 대사과정에서 포피린 합성에 기인한 적색 형광 발현에 중요한 영양 성분이며^{11,12}, 치면세균막 미세생태계 바이오필름의 적색 형광 발현에 관여하는 것으로 생각된다^{10,15}. 본 연구에서 사용된 LC, AN, PI 균 모두는 TSA와 BMM 배지 뿐만 아니라, 혈액(blood)이 첨가된 TSAB, BMMB 배지에서도 성공적으로 배양되었으며, 이를 통해 본 연구에서 사용된 배지들은 혐기성 구강 세균의 배양을 위한 적합한 성장배지임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 선행 연구에서 적색 형광 발현이 보고된 3종의 균주를 선정하였다. Lennon 등¹¹은 비타민 K와 헤민이 포함된 Columbia 배지에서 배양한 결과, LC가 오렌지색, AN과 PI가 적색 형광을 나타낸다고 보고하였으며, R/G 값은 LC가 1.18, AN이 1.88, PI가 5.91로 PI가 가장 강한 적색 형광을 나타내는 것으로 보고하였다. 해당 논문에서는 비타민 K와 헤민이 첨가된 Columbia 배지를 선정한 이유가 모든 균들의 최적의 성장 배지이며, black pigmented anaerobes는 대사과정에서 두 성분을 이용하여 포피린 합성에 관여하기 때문이라고 기술하였다. 이 논문에서는 Columbia agar에 혈액이 포함되어 있다고 기술하진 않았지만, 제시

Table 2. R/G and R/RGB value of each bacteria on TSA, TSAB, BMM, BMMB growth media

	Medium	N	<i>L. casei</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>P. intermedia</i>	P value**
R/G	TSA	15	0.97±0.03 ^a	1.10±0.07 ^b	1.35±0.11 ^c	$P < 0.001$
	TSAB	15	8.67±3.66 ^a *	6.98±1.24 ^{ab} *	6.73±1.17 ^b *	0.603
	BMM	15	1.15±0.03 ^a	1.26±0.04 ^b	1.01±0.04 ^c	$P < 0.001$
	BMMB	15	7.87±3.29 ^a *	4.49±0.52 ^a *	45.84±12.92 ^b *	$P < 0.001$
R/RGB	TSA	15	0.34±0.01 ^a	0.38±0.02 ^b	0.44±0.03 ^c	$P < 0.001$
	TSAB	15	0.73±0.05 ^a *	0.74±0.03 ^a *	0.66±0.03 ^b *	$P < 0.001$
	BMM	15	0.38±0.01 ^a	0.41±0.01 ^b	0.36±0.01 ^c	$P < 0.001$
	BMMB	15	0.69±0.05 ^a *	0.66±0.03 ^b *	0.89±0.01 ^c *	$P < 0.001$

* $P < 0.001$ by Mann-Whitney test.

**Kruskal-Wallis test, ^{abc}Duncan post-hoc test.

된 결과 사진의 배지 색이 검은색인 걸 감안하면, 혈액이 포함되어 있을 것으로 예상된다. 따라서 선행 연구에서 사용한 배지 조성에는 비타민K, 헤민, 혈액이 함유되어 있었으며, 해당 조건에서 LC, AN, PI는 적색 형광을 발현함을 추론할 수 있다. 본 연구에서도 혈액이 첨가된 TSAB, BMMB 배지에서 세 균 모두가 적색 형광을 나타내었으며, PI의 R/G 값과 R/RGB 값이 가장 크게 나타났다.

본 연구에서는 세균집락의 QLF-D 형광 촬영 이미지 상에서 적색 형광을 정량화하기 위하여 R/G와 R/RGB를 사용하였다. RGB 색체계는 디지털 영상에서 가장 기본적인 색공간 포맷으로, 빛의 특성을 이용해 색상을 표현하는 방법으로 적색, 녹색, 청색의 삼원색이 각각 최대값(225)이 되면 흰색이 되는 가산혼합법으로 색을 조합한다¹⁶⁾. 기존 연구들에서는 R/G만을 사용하였으며, 이는 QLF-D가 발광하는 청색 광의 요소를 배제하고 적색의 상대적인 강도를 정량적으로 표현하기 위해 사용한 것으로 생각된다. R/G 값이 비록 선행 연구들에서 사용된 육안으로 관찰되는 적색의 정도를 정량적으로 표현하는 타당한 방법이지만, 이 지표는 형광 이미지 상의 색의 밝기와 청색 값 정보를 배제한다는 한계가 있다. 같은 R/G 값이라 하더라도, 실제 육안으로 관찰되는 색의 정보는 전혀 다르게 나타날 수 있으며, 동일 피사체라 하더라도 주변 빛의 세기에 달리한 경우, 이미지의 RGB 값은 달라진다(예: R:G:B가 100:20:10, 200:40:20, 200:40:80인 경우). 이러한 한계점은 삼원색 각각의 색 값의 합에 대한 적색 값의 비(R/RGB)로 나타냄으로써 보완할 수 있으며, 본 연구에서는 세균집락의 적색 형광의 비중을 0부터 1사이의 수치로 정량적으로 제시할 수 있었다. 본 연구에서 PI는 BMMB 배지 상에서 R/G 값이 AN에 비해서 10.2배가 높게 분석되었지만, R/RGB 값은 1.3 배 높게 분석되었다. 이를 통해 R/RGB 값이 R/G 값보다 적색의 상대적인 비중을 밝기에 구애받지 않고 보다 실질적으로 반영하는 지표임을 알 수 있다.

본 연구 결과 혈액, 헤민, 비타민 K가 첨가된 TSAB, BMMB 배지에서는 LC, AN, PI 모두 육안으로 확인되는 적색 형광이 관찰되었으나, 혈액이 배제된 TSA, BMM 배지에서는 적색 형광이 다소 감소하는 결과를 나타냈다. 이를 통해 헤민과 비타민 K가 함유된 배지에 첨가된 혈액은 세균 집락의 적색 형광 발현을 야기하는 원인 영양 성분임을 예상할 수 있다. 비록 헤민이 혈액의 성분 중 하나인 헤모글로빈을 구성하는 금속포피린 중 하나이지만, 배양 배지 내에 헤민이 단독으로 존재할 때보다, 혈액이 함께 존재했을 때, 적색 형광 발현이 강해진 것이다. 선행 연구에서는 AN은 TSA with blood 배지 배양에서는 적색 형광이 관찰되지 않았으나, TSA with blood, vitamin K, and hemin 배지와 TSA with spinach extract 배지 배양에서는 적색 형광이 나타났다고 보고하였다¹²⁾. 본 연구 결과와 선행 연구의 결과를 종합해볼 때, 혈액은 세균 집락의 적색 형광 발현을 증가시키며, 이는 혈액 속 특정 성분이 기여하거나, 혈액 속에 함유된 헤민과 기존의 헤민의 합에 따른 포피린 물질의 절대적인 양의 증가가 원인일 것으로 추론할 수 있다. 이를 증명하기 위해서는 혈액의 적혈구 속 헤모글로빈을 배제한 혈액의 영향에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

기존의 연구들에서는 세균이 대사과정을 통해 형광을 발현

하는 metal free 포피린을 생산하기 위해서는 배지 성분 속 헤민과 비타민 K의 역할에 대한 보고는 많았지만, 본 연구에서는 혈액(blood)이 구강 세균 집락의 적색 형광 발현에 중요한 기여요소라는 것을 확인하였다. 이러한 실험적 결과를 임상적 상황에 적용해 보면, 치면세균막의 강한 적색 형광의 원인은 세균 자체의 고유한 특성^{8,11)} 또는 바이오필름의 성숙 효과⁹⁾ 뿐만 아니라, 치주병 등 구강 내 연조직 질환으로부터 기인한 출혈 또는 잠재혈액이 기여한다고 생각할 수 있다. 실제로 동일한 대상자에서 구강 내 치면 부위에 따라 적색 형광은 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있으며^{17,18)}, 적색 형광을 나타내는 치면세균막 부위와 치주병 상태와의 관련성에 대해 후후 연구해볼 가치가 있다.

본 연구에서는 적색 형광을 발현한다고 알려진 일부 균주들만을 선정하여, 고체배지 배양과정을 통해 결과를 확인하였다. 구강 내에는 수종의 균주가 상호작용하며 치면세균막을 형성하고 있기 때문에, 후후 연구에서는 이들 균주들을 이용한 단일 균주 바이오필름 모델을 통해 결과를 평가해볼 필요가 있으며, 보다 다양한 균주를 대상으로 혈액 성분이 적색 형광 발현에 미치는 영향에 대한 지속적인 연구가 필요할 것이다.

결론

적색 형광을 발현한다고 알려진 *Lactobacillus Casei*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella intermedia*에 대해, 배지 속 혈액 유무가 적색 형광 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 실험실 상에서 각 균을 배양한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *L. Casei*, *A. naeslundii*, *P. intermedia* 세균 집락의 적색 형광은 비타민 K, 헤민이 함유된 TSA 배지보다 비타민 K, 헤민, 혈액이 함유된 TSAB 배지에서 증가하였다.

2. *L. Casei*, *A. naeslundii*, *P. intermedia* 세균 집락의 적색 형광은 비타민 K, 헤민이 함유된 BMM 배지보다 비타민 K, 헤민, 혈액이 함유된 BMMB 배지에서 증가하였다.

본 연구 결과를 통해, 금속포피린인 헴과 그 이외의 다양한 성분을 포함하고 있는 혈액은 구강 균주의 적색 형광 발현에 기여하는 것으로 여겨지며, 치면세균막의 강한 적색 형광과 구강내 치주 조직의 염증성 출혈과의 관련성에 대한 연구가 필요할 것이다.

References

1. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell - cell distance. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:471-480.
2. Zijngje V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS one* 2010;24:5(2):e9321.
3. van der Veen MH, de Josselin de Jong E. Application of quantitative light-induced fluorescence for assessing early caries lesions. *Monogr Oral Sci* 2000;17:144-162.
4. 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.

5. Koenig K, Schneckenburger H, Hemmer J, Tromberg BJ, Steiner RW. In-vivo fluorescence detection and imaging of porphyrin-producing bacteria in the human skin and in the oral cavity for diagnosis of acne vulgaris, caries, and squamous cell carcinoma. *International Society for Optics and Photonics* 1994;2135:129-139
6. Fyrestam J, Bjurshammar N, Paulsson E, Johannsen A, Östman C. Determination of porphyrins in oral bacteria by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2015;407:7013-7023.
7. Thomas RZ, van der Mei HC, van der Veen MH, de Soet JJ, Huysmans MCDNJM. Bacterial composition and red fluorescence of plaque in relation to primary and secondary caries next to composite: an in situ study. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:7-13.
8. van der Veen MH, Thomas RZ, Huysmans MCDNJM, de Soet JJ. Red autofluorescence of dental plaque bacteria. *Caries Res* 2006;40:542-545.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Volgenant CMC, 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.
13. Li Zhang. *Heme Biology: The Secret Life of Heme in Regulating Diverse Biological Processes*. 1st ed. Singapore:World Scientific;2011:1-6.
14. Wong L, Sissions CH. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol* 2001;46:477-486.
15. Kim YS, Kang SM, Lee ES, Lee JH, Kim BR, Kim BI. Ecological changes in oral microcosm biofilm during maturation. *J Biomed Opt* 2016;21:101409-101409.
16. Naver corp. Terms.naver.com [Internet]. [cited 2017 Nov 013]. Available from: <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=3340383&cid=58161&categoryId=58161>.
17. Kim BI. QLF Concept and Clinical Implementation. *The Journal of the Korean Dental Association* 2011;49:443-450.
18. Hwang HR, Cho YS, Kim BI. Assessment of Clinical Applicability of a New Plaque Scoring System Using Quantitative Light-Induced Fluorescence-Digital. *J Dent Hyg Sci* 2014;14:150-157.