

인공 우식 유발성 biofilm 구성성분의 시간 흐름에 따른 변화

오 철, 판딧 신태스, 전재규

전북대학교 치과대학 예방치학교실

Changes in the composition of artificial cariogenic biofilms over time

Chul Oh, Santosh Pandit, Jae-Gyu Jeon

Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

Received: May 20, 2019

Revised: June 25, 2019

Accepted: July 11, 2019

Corresponding Author: Jae-Gyu Jeon
Department of Preventive Dentistry,
School of Dentistry, Chonbuk National
University, 567 Baekje-daero, Jeonju
54896, Korea

Tel: +82-63-270-4036

Fax: +82-63-270-4035

E-mail: dentjik@jbnu.ac.kr

https://orcid.org/0000-0002-8868-1538

*This work was supported by the National
Research Foundation of Korea (NRF)
grant funded by the Korea government
(MSIP) (No. 2016R1A2B4006378 and
2016R1A2B1008000).**Objectives:** The purpose of this study was to investigate changes in the composition of artificial cariogenic biofilms using a *Streptococcus mutans* biofilm model over a period of time.**Methods:** We analyzed the dry weight, colony forming unit (CFU) number, extracellular polysaccharide (EPS) biovolume, and acid production rate of *S. mutans* biofilms formed on saliva-coated hydroxyapatite discs after 26 h, 50 h, 74 h, 98 h, 171 h, and 195 h. In addition, we performed a laser scanning confocal fluorescence microscopy to determine the bacterial volume, EPS biovolume, and biofilm thickness. We calculated the biofilm density using dry weight and EPS biovolume.**Results:** Over a period of time, there was no change in the CFU number and acid production rate of *S. mutans* biofilms, but there was an increase in the dry weight and EPS biovolume of *S. mutans* biofilms. The bacterial volume, EPS biovolume, and biofilm thickness only increased in the 50-h-old biofilm; however, no change was observed in 50-195-h-old biofilms. In addition, an increase in the biofilm density was observed over time.**Conclusions:** These results suggest that the acid production ability of cariogenic biofilms does not change, but the biofilm density increases over time. However, due to scientific information, further research needs to be conducted in the field of dentistry to get further insights on the progression of cariogenic biofilms over time.**Key Words:** Biofilm composition, Cariogenic biofilms, Change over time, *Streptococcus mutans*

서 론

Dental biofilm (치면세균막)과 관련된 다양한 구강질환 중에서 치아우식은 가장 흔하게 발생할 뿐만 아니라 사회적, 경제적으로도 막대한 손실을 초래하고 있다¹⁾. 치아우식은 치아표면에 형성된 biofilm에 존재하는 특정 세균과 음식물의 구성 성분이 상호작용함으로써 발생한다²⁾. Biofilm이 치아표면에 형성된 후 식이성 당성분에 지속적으로 노출되면 산을 생성할 수 있을 뿐만 아니라 산에 잘 견딜 수 있는 세균이 점유종으로 자리 잡게 된다¹⁾. 산 생성, 산내성 세균이 점유종으로 되는 biofilm 구성세균의 변화는

biofilm의 pH 하강을 촉진하게 되어 치아우식을 발생하게 한다¹⁾. Dental biofilm에 존재하는 다양한 산생성, 산내성 세균 중에서도 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)는 치아우식과 관련하여 가장 중요한 세균으로 인식되고 있다.

*S. mutans*는 당을 사용하여 다량의 산을 생성할 수 있을 뿐만 아니라, 주위환경의 pH가 낮을 때에도 다양한 생리학적 활동을 통하여 dental biofilm 속에서 생존할 수 있다. 또한, glucosyltransferase를 생산하여 자당(sucrose)을 세포외 다당류(extracellular polysaccharide)로 변화시켜 dental biofilm에서 생존하는데 유리한 환경을 조성할 수도 있다³⁾. 이러한 특징으로 인하여 *S. mutans*

의 역할 및 분포는 현재까지도 치아우식 연구의 주된 연구 주제가 되고 있다. 치아우식 연구와 관련하여 *S. mutans*가 주목받기 시작한 1970년대부터 지금까지 다양한 연구가 시행되고 있다. 2000년도 초반 이전에는 주로 부유 상태(suspension state)의 *S. mutans*를 대상으로 치아우식과 관련된 생리학적, 미생물학적 연구가 주로 시행되었지만, 최근에는 biofilm 상태의 *S. mutans*를 대상으로 한 연구가 주류를 차지하고 있다. 이러한 *S. mutans* 연구 흐름 변화는 치아우식은 부유세균이 아닌 biofilm 상태의 세균으로 인해 발생한다는 인식을 반영하고 있다.

Dental biofilm 세균 구성은 진행 시간, 치아 위치, 주위 환경 등에 따라 변화된다고 알려져 있다^{4,5}. Biofilm은 일반적으로 부착, 증식, 성숙, 탈락의 과정을 거친다는 다양한 연구 결과가 존재한다^{6,7}. 하지만, 치아우식이나 치주질환 관련 dental biofilm은 서로 상이한 형성 과정을 보일 뿐만 아니라 명확한 세균 구성 차이를 보이고 있음에도 불구하고 그 변화과정에 대해 개별적으로 설명하는 연구는 찾아보기 힘들다. 특히, 치아우식 관련 dental biofilm 연구에서는 비치아우식 관련 세균들은 사라지고 최종적으로 치아우식 관련 세균이 구성세균의 대부분을 차지하게 되는 우식 유발성 biofilm이 형성된 이후 시간이 흐름에 따라 치아우식 발생과 밀접하게 관계있는 세균, 세포외 다당류 등의 주요 구성성분이 어떤 식으로 변화되는지에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

이번 연구는 인공 우식 유발성 biofilm인 *S. mutans* biofilm을 이용하여 우식 유발성 biofilm이 형성된 이후 시간의 흐름에 따라 주요 구성성분이 어떻게 변화하는지를 파악하기 위해 시행되었다.

연구대상 및 방법

1. *S. mutans* biofilm 형성과 실험설계

연구에서 사용된 균주는 *S. mutans* UA159 (ATCC 700610; serotype c)이며, 시간의 흐름에 따른 *S. mutans* biofilm의 건조중

량, 세균 수, 세포외 다당류, 산생성 능력, 부피, 두께, 밀도 등의 변화를 분석하기 위해 Fig. 1과 같은 실험설계를 구상하였으며, 각각 26, 50, 74, 98, 171, 195 시간 biofilm을 사용하여 biofilm 건조중량, 세균 수, 세포외 다당류, 산생성 능력, 부피, 두께를 측정하거나 계산하였다.

S. mutans biofilm은 24-well plate에 saliva-coated hydroxyapatite (SHA) disc (2.93 cm²; Clarkson Chromatography Products, Inc., South Williamsport, PA, USA)를 수직으로 위치시킨 후(1개 disc/well) 형성하였으며, biofilm 형성 방법은 과거 Pandit 등⁸의 연구에서 사용된 방법과 동일하다. SHA disc는 실험 당사자의 타액을 0.22- μ m low protein-binding filter에 통과시킨 후 HA disc와 함께 37°C에서 1시간 동안 incubation시켜 준비하였다. *S. mutans* UA159 (2-5 \times 10⁶ colony-forming units (CFU)/ml, 2.8 ml/disc)와 1% sucrose (w/v) ultrafiltered (10 kDa molecular weight) tryptone yeast-extract broth가 담겨있는 24-well plate에 SHA disc를 옮겨 biofilm 형성을 시작하였다. Biofilm이 안정화되도록 22시간 동안 배양한 후 이때부터 하루에 2번(오전 9시, 오후 6시) 실험기간 동안 배지를 교체하였다. 이번 연구에서는 26, 50, 74, 98, 171, 195시간 biofilm을 사용하였다.

2. Biofilm 건조중량, 세균 수, 세포외 다당류 측정

각각 26, 50, 74, 98, 171, 195시간 *S. mutans* biofilm을 금속 spatula를 이용하여 SHA disc로 부터 분리한 후, 초음파를 이용하여(7 W 강도로 30초간 3번 반복; VCX 130PB; Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA) 균질화된 biofilm 용액 5 ml를 만든 다음 Chau 등⁹의 방법을 사용하여 건조중량, 세균 수, 세포외 다당류를 분석하였다. Biofilm CFU 수는 biofilm 균질화 용액 0.1 ml를 연속하여 희석시킨 후 BHI agar plate에 배양하여 측정하였다. Biofilm 건조중량과 세포외 다당류는 남은 biofilm 균질화 용액 4.9 ml를 4°C에서 20분간 3,000 g로 원심분리한 후 물 4.9

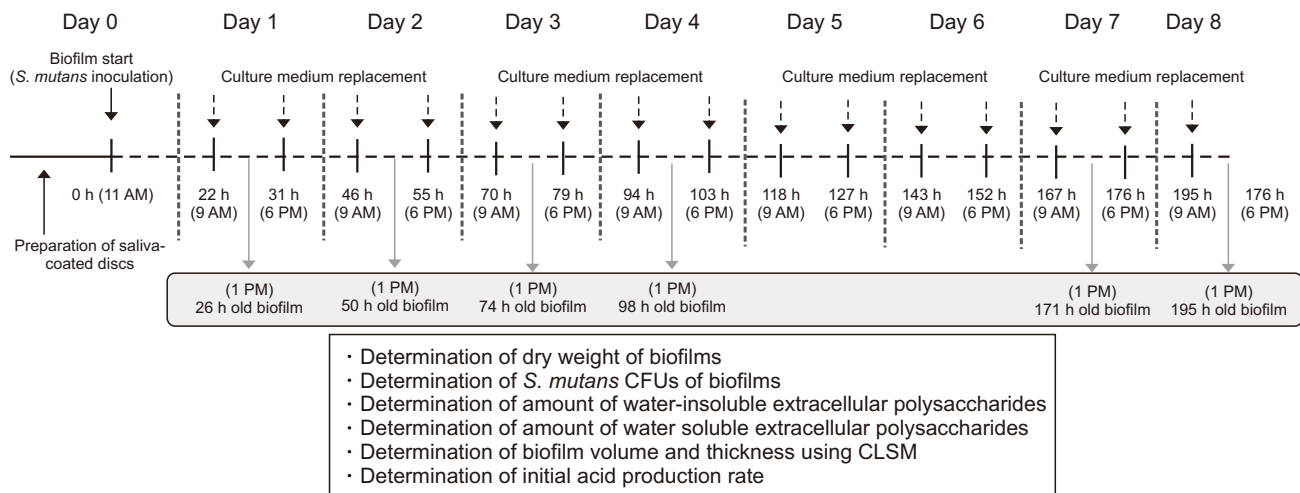


Fig. 1. *S. mutans* biofilm formation and experimental scheme for the present study. CFUs and CLSM represent colony forming units and confocal laser scanning microscope, respectively.

ml에 다시 부유시켰으며, 이 과정을 2번 반복하여 biofilm을 세척하였다. 세척된 biofilm 용액 4.9 ml의 일부분(100 μ l)을 동결 건조하여 biofilm 무게를 측정하였다. Water-soluble 세포의 다당류는 세척과정 중에 만들어진 세척액 9.8 ml를 에탄올로 세포의 다당류를 침전시킨 후 phenol sulfuric acid assay로 측정하였다. Water-insoluble 세포의 다당류는 건조중량 측정에 사용된 건조 biofilm으로 부터 1 N sodium hydroxide를 사용하여 세포의 다당류를 추출한 후 phenol sulfuric acid assay로 측정하였다.

3. Biofilm 산생성 능력 측정

S. mutans biofilm 산생성 능력은 Belli 등¹⁰⁾의 방법을 사용하여 측정하였다. 각각의 26, 50, 74, 98, 171, 195시간 *S. mutans* biofilm을 salt solution (50 mM KCl+1 mM MgCl₂, pH 7.0)이 담겨있는 6-well plate에 옮긴 후 glass electrode를 사용하여 산생성 정도를 120분간 측정하였다. Salt solution의 pH는 0.2 M KOH를 사용하여 7.0으로 조정하였으며, biofilm이 담겨져 있는 6-well plate에 포도당(최종농도: 1% w/v)을 첨가하면서 부터 시작되는 pH 변화를 측정하였다. Biofilm 산생성 능력 파악을 위해 실험에서 얻어진 pH 하강 곡선 중 선형을 이루는 부분인 0-50분까지의 산생성 속도를 계산하였다⁸⁾.

4. Biofilm 부피 및 두께 측정

Biofilm 부피와 두께를 분석하기 위해 Pandit 등¹¹⁾의 공초점 레이저 현미경 이미지 분석법을 사용하였다. 세포의 다당류의 부피와 두께를 분석하기 위하여 본 연구에서 사용한 26, 50, 74, 98, 171, 195시간 *S. mutans* biofilm의 형성기간 동안 1 μ M Alexa Fluor 647-labeled dextran conjugate (10,000 MW; absorbance/fluorescence emission maxima 647/668 nm; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)를 배지에 첨가하여 세포의 다당류를 염색하였다. 각각의 biofilm이 형성된 이후에는 biofilm 세균

의 부피와 두께를 분석하기 위하여 2.5 μ M SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain (480/500 nm; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA)을 사용하여 30분 동안 염색하였다. 공초점 현미경 이미지는 아르곤 이온과 헬륨-네온 레이저가 장착된 LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Germany)를 사용하여 얻었다. 각각의 *S. mutans* biofilm마다 최소한 6번의 독립적인 반복 실험을 시행하였으며 각 실험마다 5 image stack (512-pixel tagged image file format)을 구했다. Biofilm 세균과 세포의 다당류의 부피(μ m³/ μ m²)와 두께(μ m)는 공초점 현미경 이미지를 이용하여 COMSTAT 프로그램으로 계산하였다¹²⁾.

5. Biofilm 밀도 계산

Biofilm 밀도는 앞에서 분석한 biofilm 건조중량과 공초점 현미경 이미지 분석으로 얻어낸 biofilm 부피(세균 부피+세포의 다

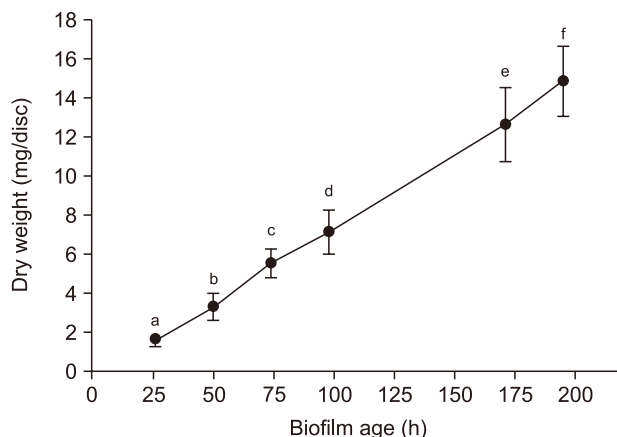


Fig. 2. Change over time in dry weight of *S. mutans* biofilms. The data represent the mean \pm SD (n=8). Values followed by the same superscript are not significantly different from each other.

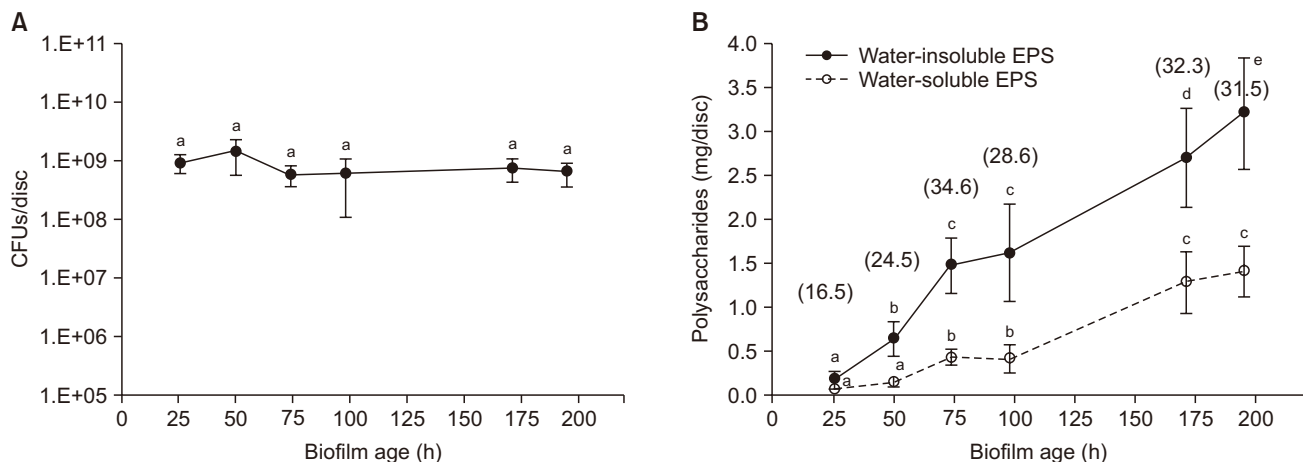


Fig. 3. Change over time in CFUs (A) and extracellular polysaccharides (EPS, B) of *S. mutans* biofilms. The numbers in parenthesis represent the percentage of water-insoluble and water-soluble polysaccharide out of dry weight. The data represent the mean \pm SD (n=8). Values followed by the same superscript are not significantly different from each other.

당류 부피)를 이용하여 계산하였다. 본 연구에서는 biofilm 밀도를 ($\mu\text{g}/\mu\text{m}^3$) 구하기 위해 biofilm 건조중량($\mu\text{g}/\mu\text{m}^2$)을 biofilm 부피($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)로 나누었다.

6. 통계분석

공초점 레이저 현미경 이미지 분석을 제외한 모든 실험은 최소 8번의 독립적인 반복 실험을 시행하였으며 모든 자료는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 집단 간 차이를 분석하기 위해 일원변량 분석을 시행하였으며, 사후검증을 위해 Tukey test를 이용하였다. P값이 0.05보다 작은 경우를 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

연구 성적

1. 시간에 따른 biofilm 건조중량, 세균 수, 세포외 다당류의 변화

Fig. 2에서 볼 수 있듯이, 26시간 *S. mutans* biofilm의 건조 중량은 1.55 mg/disc였지만 biofilm age가 증가함에 따라 점차적으로 증가하여 98시간과 195시간에서는 각각 7.13 mg/disc와 14.84 mg/disc를 보였다. 전체적으로, 26시간에서 195시간까지의 *S. mutans* biofilm 건조중량은 biofilm age 의존적으로 증가하였다.

건조중량과는 다르게 *S. mutans* biofilm의 CFU 수는 biofilm age가 변화하여도 증가하거나 감소하지 않았다(Fig. 3A). 전체적으로, 26시간에서 195시간까지의 *S. mutans* biofilm의 CFU 수는 5.9×10^8 – 1.4×10^9 CFU/disc를 보였다. 하지만, *S. mutans* biofilm의 세포외 다당류는 수용성, 비수용성 여부에 관계없이 biofilm age가 증가함에 따라 점차적으로 증가하였다(Fig. 3B). 세포외 다당류는 전체적으로 건조중량의 16.4–43.6%를 차지하였다. 비수용성 세포외 다당류는 26 시간 *S. mutans* biofilm에서 0.19 mg/disc였지만, biofilm age가 증가함에 따라 점차적으로 증가하여 98 시간과 195 시간 *S. mutans* biofilm에서는 각각 1.62 mg/

disc와 3.21 mg/disc를 보였다. 수용성 세포외 다당류는 26시간 *S. mutans* biofilm에서 0.07 mg/disc였지만 biofilm age가 증가함에 따라 점차적으로 증가하여 98시간과 195시간 *S. mutans* biofilm에서는 각각 0.41 mg/disc와 1.41 mg/disc를 보였다.

2. 시간에 따른 biofilm 산생성 능력의 변화

Fig. 4에서 볼 수 있듯이, *S. mutans* biofilm의 산생성 능력은 biofilm age가 변화하여도 증가하거나 감소하지 않았다. 전체적으로, 26시간에서 195시간까지의 *S. mutans* biofilm의 산생성으로 인하여 pH 값이 50분 동안 1.94–2.16 정도 하강하였다.

3. 시간에 따른 biofilm 부피와 두께 변화

Fig. 5A에서 볼 수 있듯이, *S. mutans* biofilm 세균과 세포외 다당류의 부피는 25시간에서 50시간 biofilm까지는 증가하지만 그 이후로는 일정 수준을 유지하고 있다. 50시간에서 195시간까

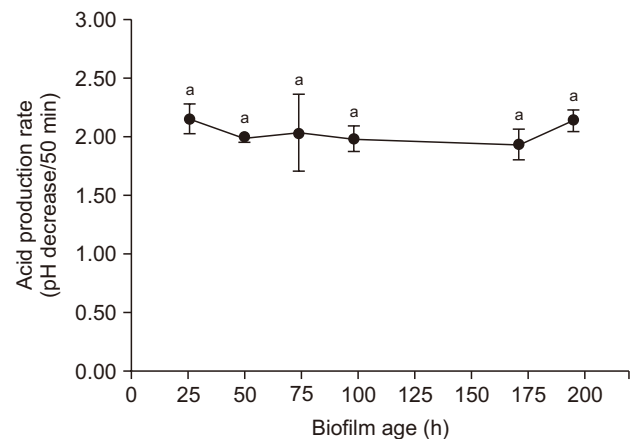


Fig. 4. Changes over time in acidogenic ability of *S. mutans* biofilms. The data represent the mean \pm SD (n=8). Values followed by the same superscript are not significantly different from each other.

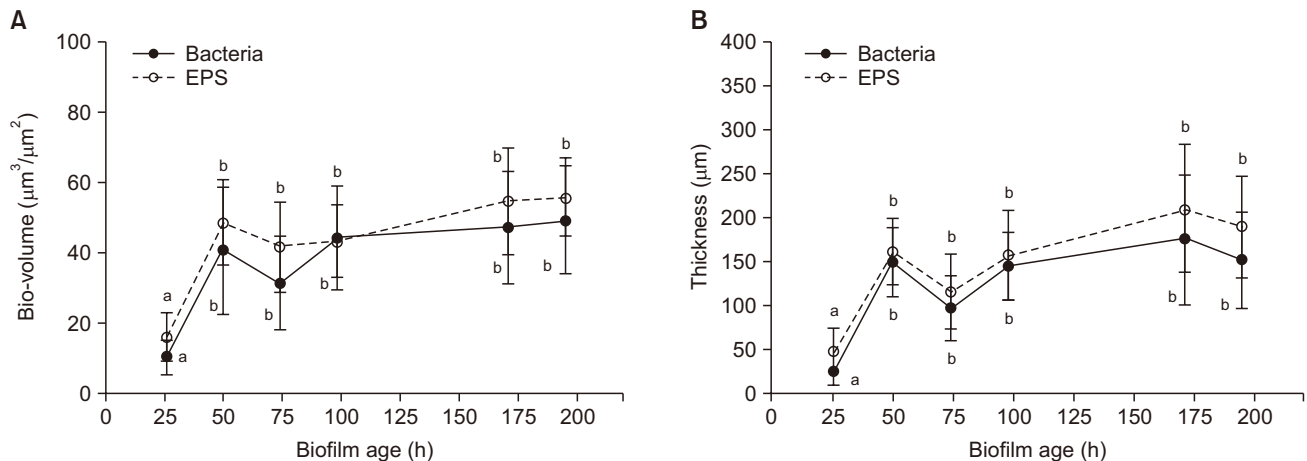


Fig. 5. Changes over time in bio-volume (A) and thickness of bacteria or extracellular polysaccharide (B) in *S. mutans* biofilms. The data represent the mean \pm SD (n=6). Values followed by the same superscript are not significantly different from each other.

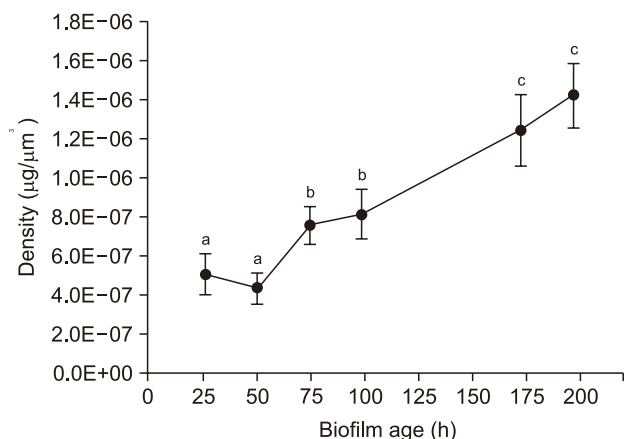


Fig. 6. Changes over time in density of *S. mutans* biofilms. The data represent the mean \pm SD (n=6). Values followed by the same superscript are not significantly different from each other.

지의 *S. mutans* biofilm에서 세균은 $31.7\text{--}49.2 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ 부피를 유지하였으며 세포의 다당류는 $41.8\text{--}55.7 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ 부피를 유지하였다. *S. mutans* biofilm 두께도 부피와 비슷하게 25시간에서 50시간 biofilm까지는 증가하지만 그 이후로는 일정 수준을 유지하고 있다(Fig. 5B). 50시간에서 195시간까지의 *S. mutans* biofilm에서 세균은 $98.9\text{--}175.7 \mu\text{m}$ 두께를 유지하였으며 세포의 다당류는 $116.7\text{--}210.7 \mu\text{m}$ 두께를 유지하였다.

4. 시간에 따른 biofilm 밀도 변화

Fig. 6에서 볼 수 있듯이, 26시간과 50시간, 74시간과 98시간, 171시간과 195시간 *S. mutans* biofilm 밀도는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 하지만, 전체적으로 보면 biofilm age가 증가함에 따라 밀도가 증가하는 경향을 보였다.

고 안

Biofilm은 세포의 다당류가 세균의 micro-colony를 감싸고 있는 조직화된 구조를 보인다^{13,14}. 일반적으로 biofilm은 세균이 표면에 부착한 이후 micro-colony를 이루기 시작하여 최종적으로는 세포의 다당류로 감싸져 있는 안정적인 구조로 발전하게 된다. 자연계에 존재하는 다른 biofilm과 마찬가지로 임상적으로 dental plaque로 알려진 dental biofilm도 위와 같은 발전 단계를 갖는다¹⁵. 이번 연구에서는 치아우식 관련 세균이 biofilm 구성세균의 대부분을 차지하게 되는 우식 유발성 dental biofilm이 안정화된 구조를 이룬 이후, 시간 흐름에 따라 어떻게 발전하는지에 대해 연구하였다. Dental biofilm이 언제 안정화된 구조를 이루는지에 대한 명확한 연구 결과는 현재까지 없다. 하지만, 과거 본 연구실의 연구결과에 근거하여, *S. mutans* biofilm은 1% 자당을 첨가하는 경우 SHA 표면에 부착하기 시작한 이후 약 24-48시간에 본격적으로 안정화된 구조를 이룬다고 생각되기 때문에 이번 연구에서는 26-195시간까지의 biofilm을 연구대상으로 삼았다.

Biofilm의 구성 성분 중 세포의 다당류는 biofilm micro-colony의 공간적 배열을 유지시켜 biofilm을 안정화 시킬 뿐만 아니라 biofilm 내부로의 물질 확산 능력을 감소시킨다고 알려져 왔다^{13,14}. 이번 연구에서, 세포의 다당류는 26-195시간 동안 biofilm age 의존적으로 증가하는 경향을 보이고 있다(Fig. 3B). 이러한 결과는 biofilm 형성 이후 시간이 증가할수록 biofilm 세균의 micro-colony는 세포의 다당류로 인해 보다 구조적으로는 안정화될 수 있지만, SHA 표면 가까이 있는 세균은 영양분 및 기타 물질의 확산이 제한되어 생존에 영향을 받을 수 있다는 것을 제시하고 있다. Fig. 3A에 볼 수 있듯이, 이번 연구에서는 biofilm CFU 수가 26-195시간 동안 통계적으로 변화되지 않는데, 이 결과는 biofilm age가 많은 경우에도 세포의 다당류 증가로 인해 영양분의 biofilm 내부로 확산이 제한되어 biofilm 내부 세균이 사멸하게 되어 전체적으로 일정 수준의 세균 수가 유지되기 때문이라고 생각된다. 하지만, 실제 사멸한 세균의 비율이 biofilm 표면 근처보다 SHA 표면 가까에서 높은 지에 대해서는 보다 심도 있는 연구가 필요하다.

Dental biofilm 건조 중량의 약 40%를 세포의 다당류가 차지한다고 알려져 있지만¹⁵, 이번 연구에서 세포의 다당류는 건조중량의 16.5-34.6%를 차지하였다(Fig. 3A). 이러한 차이는 biofilm 세포의 다당류의 형성 정도는 탄수화물 섭취 정도(농도, 횟수)와 연구대상의 biofilm 획득 시간에 따라 달라질 수 있다는 과거 연구 결과¹⁵ 반영하는 것이라고 생각된다. 하지만, 치아우식 및 치주 질환 발생과 관련된 dental biofilm의 시간에 따른 구성성분 특히 세포의 다당류의 변화와 주위환경(당 농도, biofilm 형성 장소 등)의 관련성에 대해 명확히 설명한 연구는 찾아보기 힘든 실정이기 때문에, 본 연구와 dental biofilm의 세포의 다당류 차이에 대해 명확히 설명하기는 어렵다.

이번 연구에서 26-195시간까지의 *S. mutans* biofilm의 산생성 속도는 서로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). 이러한 결과는 *S. mutans* biofilm 형성시간에 관련 없이 생존 세균 수는 일정하게 유지된다는 Fig. 3A의 결과로써 설명될 수 있으며, biofilm이 안정화되면 biofilm age와 관계없이 치아우식을 유발할 수 있는 능력이 일정하게 유지될 수도 있다는 사실을 암시하고 있다. 하지만, 사람에게 치아우식을 유발하는 dental biofilm에서도 안정화 이후 치아우식을 유발할 수 있는 능력이 실제 일정하게 유지되는지에 대해서는 향후 보다 심도 있는 연구가 필요하다고 생각된다. Fig. 4의 결과는 biofilm age에(26-195시간) 관계없이 생존 세균의 비율이 SHA 표면 근처 보다 biofilm 표면 근처에서 높을 수 있다는 가능성도 제시하고 있다. Biofilm age가 많으면 많을수록 세포의 다당류도 많이 생성되기 때문에(Fig. 3B) biofilm 내부에서 외부로의 확산은 억제될 수밖에 없다. Biofilm 내부에서 외부로의 확산이 억제되면 내부 세균이 만들어낸 산도 외부까지 확산이 지체될 수밖에 없지만, Fig. 4의 결과가 보여주는 일정한 산생성 속도는 biofilm age에 관계없이 생존 세균의 비율이 biofilm 표면 근처에서 높을 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 더욱이 26-195시간 *S. mutans* biofilm의 10, 20, 30, 40, 50분 동안의 산생성

속도를 계산해 보았을 때도 서로 차이가 없었다는 사실은 이러한 가능성을 더욱 높게 한다(비제시 자료).

이번 연구에서는 *S. mutans* biofilm 시간의 흐름에 따라 건조 중량, 세포외 다당류의 양이 증가하였지만, biofilm 부피는 50시간 이후부터 증가하지 않았다(Fig. 5A). 위 결과는 biofilm 밀도가 시간에 따라 변하고 있다는 것을 암시하고 있기 때문에 이번 연구에서는 biofilm age에 따른 밀도 변화를 계산하였다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 biofilm age가 증가함에 따라 밀도가 증가하는 경향을 보였다. 하지만, 밀도는 시간에 따라 증가하고 있지만 biofilm 두께는 50시간 이후부터 증가하지 않았다(Fig. 5B). 이러한 결과는 *S. mutans* biofilm이 시간이 흐름에 따라 무게는 증가하지만, 두께와 부피가 일정하게 유지되어 결과적으로 biofilm 밀도가 증가하게 된다는 것을 제시하고 있다. 만약 사람의 구강 내 dental biofilm에서도 시간 흐름에 따라 밀도가 증가하게 된다면 오래된 dental biofilm은 타액의 흐름, 구강 주위 근육의 움직임 등에 의해 유발되는 자정작용의 효과가 감소될 수 있는 가능성을 이번 연구는 암시하고 있다. 하지만, 현재까지도 시간 흐름에 따른 dental biofilm 밀도 변화 연구는 찾아보기 힘들기 때문에 향후 보다 심도 있는 연구가 필요하다고 생각한다.

결 론

이번 연구는 치아우식 관련 세균이 biofilm 구성세균의 대부분을 차지하게 되는 우식 유발성 dental biofilm이 안정화된 구조를 이룬 이후, 시간이 흐름에 따라 어떻게 발전하는지에 대해 *S. mutans* biofilm을 이용하여 연구하였다. 이를 위해 26-195시간 *S. mutans* biofilm의 건조중량, CFU 수, 세포외 다당류의 양, 산생성 속도, 부피, 두께, 밀도를 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *S. mutans* biofilm 건조중량과 세포외 다당류는 시간이 흐름에 따라 증가하였다.
2. *S. mutans* biofilm CFU 수와 산생성 속도는 시간이 흘러도 일정하게 유지되었다.
3. *S. mutans* biofilm 부피, 두께, 밀도는 50시간 이후부터는 시간이 흘러도 일정하게 유지되었다.

이상의 결과를 종합해보면, 우식 유발성 dental biofilm이 안정화된 구조를 이룬 이후, 시간이 흐름에 따라 산생성 능력은 변화되지 않을 수 있지만, 밀도 증가로 인하여 구강 내 자정작용 효과가 감소될 수 있는 가능성을 암시하고 있다. 하지만, 사람에서의 치아우식 관련 dental biofilm의 변화과정에 대해 보다 과학적인

결론을 내리기 위해서는 심도 있는 연구가 절실한 실정이다.

ORCID

Chul Oh, <https://orcid.org/0000-0002-7754-2719>

Santosh Pandit, <https://orcid.org/0000-0002-3143-2944>

References

1. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149:279-294.
2. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res* 2011;45:243-263.
3. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011;45:69-86.
4. Palmer RJ Jr. Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontol* 2000 2014;64:20-39.
5. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol* 2000 2011;55:16-35.
6. Cook LC, Dunne GM. The influence of biofilms in the biology of plasmids. *Microbiol Spectr* 2014;2:0012.
7. Nyame TT, Lemon KP, Kolter R, Liao EC. High throughput assay for bacterial adhesion on acellular dermal matrices and synthetic surgical materials. *Plast Reconstr Surg* 2011;128:1061-1068.
8. Pandit S, Kim HJ, Song KY, Jeon JG. Relationship between fluoride concentration and activity against virulence factors and viability of a cariogenic biofilm: *in vitro* study. *Caries Res* 2013;47:539-547.
9. Chau NP, Pandit S, Jung JE, Jeon JG. Evaluation of *Streptococcus mutans* adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. *J Dent* 2014;42:726-734.
10. Belli WA, Buckley DH, Marquis RE. Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Can J Microbiol* 1995;41:785-791.
11. Pandit S, Cai JN, Song KY, Jeon JG. Identification of anti-biofilm components in *Withania somnifera* and their effect on virulence of *Streptococcus mutans* biofilms. *J Appl Microbiol* 2015;119:571-581.
12. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 2000;146:2395-2407.
13. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005;13:20-26.
14. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 2007;189:7945-7947.
15. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol* 2010;192:3024-3032.