Original Article

대한치과재료학회지 51(1):15-28, 2024
Korean Journal of Dental Materials (*Korean J Dent Mater*)
ISSN:2384-4434 (Print); 2384-3268 (Online)
Available online at http://www.kadm.org
http://dx.doi.org/10.14815/kjdm.2024.51.1.15

# 저주기 구형파 양전압의 인가가 치주 추정 병원균 *Aggregatibactor actinomycetemcomitans*의 동정에 미치는 영향

김화목[1], 박정환[1], 전영미[1], 김정기[1], 장용석[2], 이민호[2], 배태성[2,*]

[1]전북대학교 치과대학 치과교정학교실 및 구강생체과학연구소
[2]전북대학교 치과대학 치과생체재료학교실, 생체흡수성소재연구소 및 구강생체과학연구소

# Effects of low-frequency positive square wave voltage on putative periodontal pathogen *Aggregatibactor actinomycetemcomitans*

*Hwa-Mok Kim[1], Jeong-Hwan Park[1], Young Mi Jeon[1], Jong Ghee Kim[1], Young Seok Jang[2], Min Ho Lee[2], Tae-Sung Bae[2,*]*

*[1]Department of Orthodontics, Institute of Oral Biosciences, School of Dentistry, Jeonbuk National University, Jeonju, Republic of Korea*
*[2]Department of Dental Biomaterials, Institute of Biodegradable Materials and Oral Bio-Science, School of Dentistry, Jeonbuk National University, Jeonju, Republic of Korea*

The extremely low frequency-electromagnetic field (ELF-EMF) refers to the frequency range of 0-300 Hz. It has been reported that it causes biological effects on cell survival, growth, and function. Structural changes were observed in the cell membranes of bacteria exposed to a certain intensity of ELF-EMF, indicating that exposure of bacteria to ELF-EMF can directly affect the cell membrane and affect the survival and growth of bacteria. The purpose of this study was to investigate the effect of the application of low frequency square wave positive voltages on *Aggregatibactor actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), a putative pathogen of periodontal disease. A square wave positive voltage output of 20 V or less at low frequency (0-300 Hz) was applied to *A. actinomycetemcomitans* in a range of 60 minutes. Changes in the population of bacteria were observed by absorbance measurement, colony forming unit (CFU/ml) evaluation, and high-resolution field-emission scanning electron microscopy (HR FE-SEM). The results show that the most effective offset and frequency in inhibiting bacterial growth are 0.7V and 7.83 Hz (Schumann resonance). As the applied time increased and the voltage increased, it was effective in inhibiting bacterial growth. These results led to the conclusion that bacterial growth can be inhibited even at low frequencies below 10 Hz, and it was experimentally proven that the frequency, voltage setting, and exposure time of ELF-EMF have a significant effect on reducing the growth of *A. actinomycetemcomitans*.

**Keywords** : *A. actinomycetemcomitans*, Extremely low frequency-electromagnetic field, Schumann resonance

Hwa-Mok Kim (ORCID: 0009-0008-2811-4700)
Jeong-Hwan Park (ORCID: 0009-0000-0422-1693)
Young Mi Jeon (ORCID: 0000-0003-1446-313X)
Jong Ghee Kim (ORCID: 0000-0002-6138-0006)
Young Seok Jang (ORCID: 0000-0002-2757-232X)
Min Ho Lee (ORCID: 0000-0001-6142-4876)

*Correspondence: Tae-Sung Bae (ORCID: 0000-0002-8307-4544)
567 Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju 54896, Republic of Korea
Affiliation: Department of Dental Biomaterials and Institute of Biodegradable Material, Institute of Oral Bioscience, School of Dentistry, Jeonbuk National University, Jeonju, Republic of Korea
Tel: +82-63-270-4040, E-mail: bts@jbnu.ac.kr

Received: Feb. 27, 2024; Revised: Mar. 22, 2024; Accepted: Mar. 26, 2024

## 서 론

극저주파 전자기장(extremely low frequency-electromagnetic field; ELF-EMF)은 주파수 300 Hz 이하의 범위를 일컫는다(1).

이 범위는 세포의 생존, 성장 및 기능 등에서 생물학적 효과를 유발하는 것이 보고되었다(2). Sevil Yalçin에 따르면 전자기장은 생명체의 세포 내 이온 운반과 생리학적 반응 및 세포 사이의 신호전달에 영향을 미칠 수 있다는 것을 밝혔다(3). Sule Oncul는 일정한 강도의 ELF-EMF에 노출된 세균의 세포막에서는 구조적 변화가 나타났다고 하였으며, 이러한 결과는 세균이 ELF-EMF에 노출되었을 때 세포막에 직접적인 영향을 미쳐서 세균의 생존 및 증식에 영향을 미칠 수 있다는 것을 의미한다(4).

치의학 분야에서 bioflim 조절을 위해 전자기장의 영향에 대한 검토가 진행되었다. Costerton 등은 항생제와 전기장의 병용 시 항생제의 효과가 증가되어 bioflim 내 세균이 더욱 효과적으로 제거됨을 발표하였다. 이는 전자기적 힘이 biofilm의 매트릭스를 파괴하여 항생제가 보다 더 깊숙히 침투할 수 있도록 유도하였기 때문이었다. 또한, 전기장은 반응성 산소종을 증가시켜서 항생제의 항균 작용을 더욱 향상시켰다고 하였다(5). Del Pozo 등의 systemic review에서는 전기적 자극이 biofilm의 생성, 안정성 및 성장에 영향을 미칠 수 있다고 하였고, 또한, 전기적 자극이 세균의 생존, 분화, 항생물질에 대한 저항성에도 영향을 미칠 수 있다고 하였다(6). 이러한 결과로 미루어 알 수 있듯이, 생체에 대한 전기 인가는 biofilm의 치료 가능성에 대하여 시사하고 있다. 전기 자극을 실제 임상에서 적용한 연구도 진행되었다. Lee는 미세전류가 흐르는 칫솔(Proxywave® toothbrush)을 사용한 그룹이 일반 칫솔을 사용한 그룹에 비해 치간치은 염증지수가 유의미하게 감소하였음을 언급하였다(7).

치아 표면에는 치아 협착물(plaque)이 생성되며, 이는 외부 세균 균주의 침략을 방지하는 역할을 하기도 한다. 하지만 plaque 내부 평형이 깨지면, 미생물 균형의 변화가 일어나 구강 질환의 발병 가능성을 증가시킬 수 있다. Plaque는 산성 환경에 노출되면 산성에 민감한 균주를 억제하고 산성균주를 선택하는 경향이 있으며, 이 때문에 치은 연하에서는 염증성 반응이 일어나 치은 열구액의 흐름을 증가시켜서 혐기성의 그람 음성균이 주된 세균으로 구성된다(8). 치은 연하의 그람 음성 혐기성 세균은 *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Fusobacterium*, *Aggregatibactor actinomycetemcomitans* 등이 있다(9). 이러한 특정 세균들의 과잉증식으로 인해 치주 질환이 발생하며, 치주 질환 예방 및 치료를 위해서는 위와 같은 세균의 억제가 요구된다. 기존의 연구들은 기계적, 화학적 방법에 의한 세균 억제가 주를 이뤘다. 본 연구는 구강 내 치주질환 추정 세균에 대한 극저주파 전자기장의 효과를 다룬 연구라는 점에서 의의가 있다.

본 연구의 목적은 주요한 치주질환 추정 병원균의 한 종류인 *Aggregatibactor actinomycetemcomitans* (이하 *A.a*)에 대한 저주기 구형파 양전압의 인가가 그의 동정에 미치는 영향을 알아보기 위함이다. 본 연구의 귀무가설은 *A.a*에 저주기 구형파 양전압을 인가할 때 주파수, offset, 전압 및 인가시간의 변화가 *A.a*의 동정에 영향을 미치지 않는다는 것이다

## 재료 및 방법

### 1. 저주기 구형파 양전압의 발생장치

본 연구에서는 1000 Hz 이내의 저주파 구형파 양전압을 발생하도록 설계된 제너레이터(generator, Square

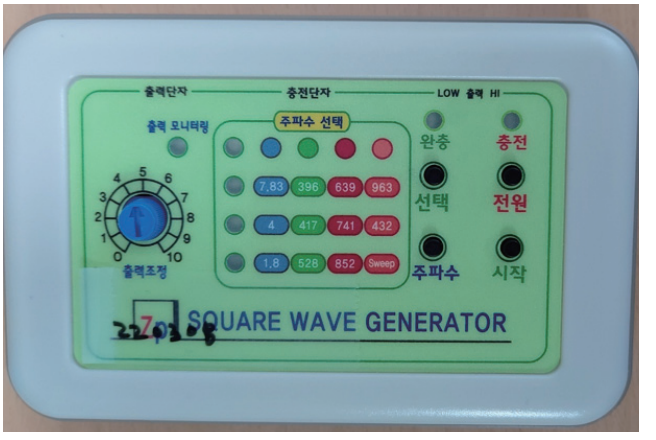


**Figure 1.** Generator for positive square wave voltage.

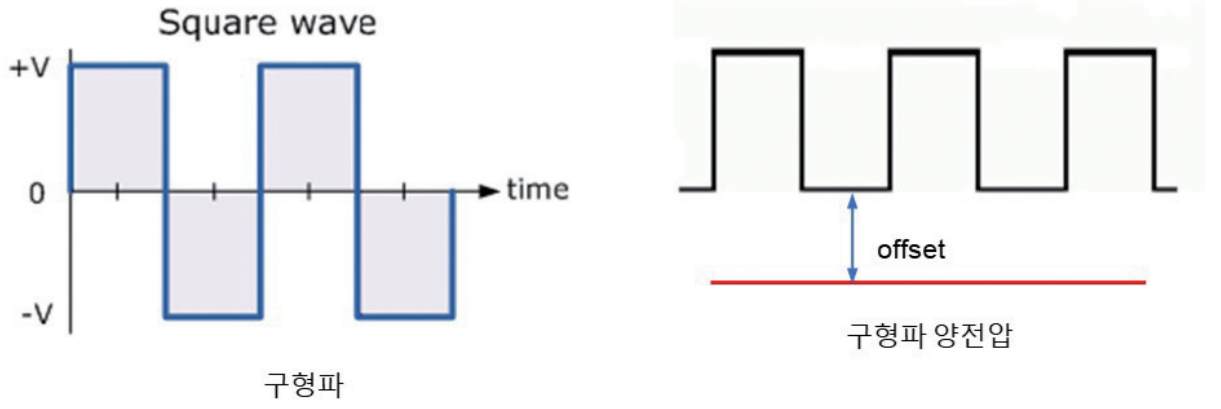


**Figure 2.** An example of positive square voltage waveform with an offset applied to set it as positive voltage.

Wave Generator, Hass, Gangneung, Gangwon-do, Korea)를 사용하였다. 인가한 전압이 세균의 개체수 변화에 미치는 영향을 평가하기 위해 제너레이터의 전압과 오프셋(offset)의 수준 및 주파수를 조절하였다(Figure 1).

구형파(square wave)는 Figure 2와 같은 파형을 가지며 양전압을 유지하기 위한 offset을 실험에서 부여하였다.

Figure 3은 제너레이터의 출력전압과 배지전압 사이의 관계를 도시한 것으로, 출력전압과 배지전압 사이에는 아래 식의 관계가 성립한다.

$$VB = 0.26VG + 1.4 \quad (1)$$

VB : Voltage broth output, 배지전압

VG : Voltage generator output, 제네레이터 출력전압

실험에 사용한 제너레이터의 출력전압은 5 V, 10 V, 15 V, 20 V 이다. 이를 출력전압과 배지전압의 관계식 (1)에 의거하여 변환하면 배지전압은 각각 2.7 V, 4.0 V, 5.3 V, 6.5 V에 상당한다(Figure 3).

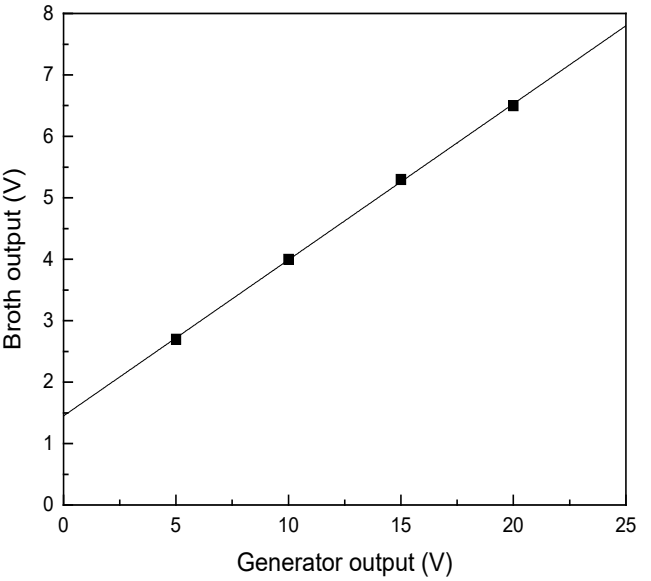


**Figure 3.** Relationship between the output voltage of a generator and the broth voltage.

## 2. 표준 균주

본 연구에서 사용한 표준 균주는 그람음성 막대균인 *Aggregatibactor actinomycetemcomitans* KCOM 1304로 한국구강미생물자원은행부터 분양을 받았다. Brain Heart Infusion (BHI) broth를 배지를 사용하여 37 ℃, 5% $CO_2$ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양한 후 DensiCHEK plus 탁도계로 균수를 $1.5\times10^8$으로 조정하여 실험에 사용하였다.

## 3. 흡광도 측정

$1.5\times10^8$의 균을 24 well에 1 ml씩 분주하고 20 V 이하의 구형파 양전압 출력을 60분의 범위에서 인가하였다. 이후 전압을 인가한 균액을 96 well에 200 µl 씩 주입하고 ELISA reader (Precision microplate reader,

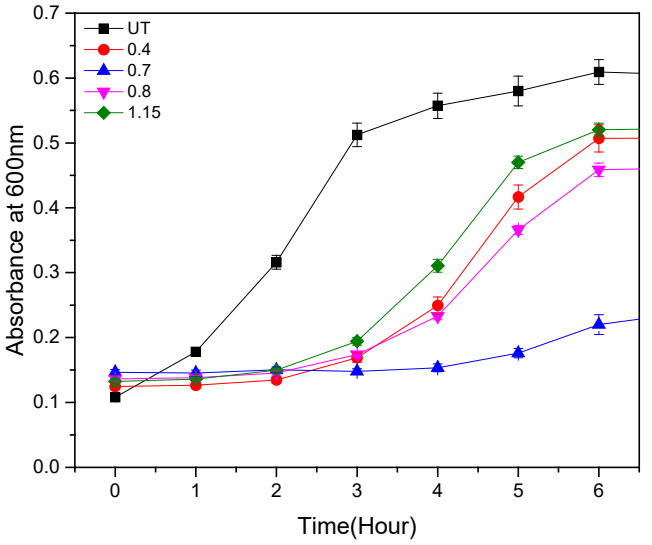


**Figure 4.** Absorbance changes when applying a Broth voltage of 5.3 V to *A.a* at 7.83 Hz for one hour with offsets of 0.4 V, 0.7 V, 0.8 V, and 1.15 V. (UT: Untreated Control Group)

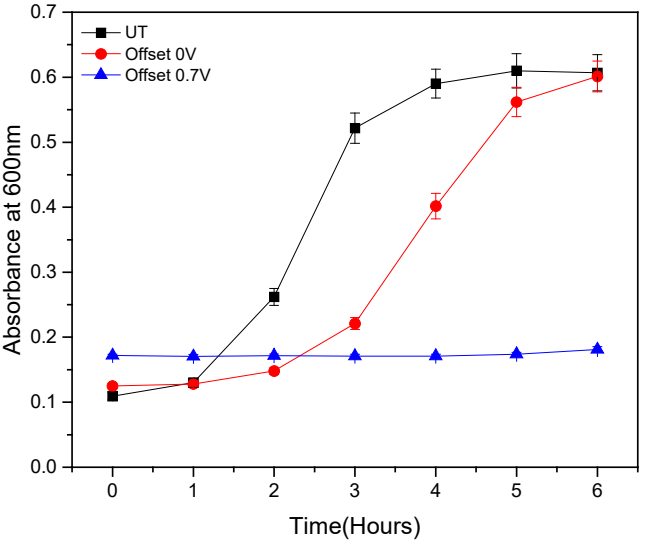


**Figure 5.** Absorbance changes when applying a Broth voltage of 6.5 V to *A.a* at 7.83 Hz for one hour with offsets of 0V, 0.7 V (UT: Untreated Control Group)

Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 600 nm에서 시간대별 흡광도를 측정하였다.

### 4. CFU (colony forming unit)

전압을 인가한 균액은 최종 $10^3$으로 희석하여 고체배지에 100 μl 씩 분주하고 도말 24시간 후 집락수를 확인하였다. 고체배지는 혈액우무배지(BAP)로 (주)반디오에서 구입하여 사용하였다. 집락형성능(CFU/ml)은 다음의 식을 이용하여 얻었다.

집락형성능(CFU/ml) = 성장한 미생물 집락의 수 × 1/희석배수 × 1/접종량(ml)

위 식을 통해 얻은 결과 값은 one-way ANOVA test를 통한 통계적 유의성을 검증하였다. 이 후 Tukey 다중범위검증법을 적용하여 각 군 사이의 차이를 비교하였다.

### 5. FE-SEM

15×15 mm 순 티타늄 박판을 산세처리한 후 전압을 인가한 균액을 100 μl 분주하고 37℃, 5% $CO_2$ 인큐베이터에서 4시간 동안 배양하고 건조한 후 osmium을 코팅하고 고해상도 전계방출 주사전자현미경(HR FE-SEM, SU8230, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

실험은 offset, 주파수, 전압, 인가시간을 변화시키며 *A.a*를 가장 효과적으로 억제할 수 있는 조건을 찾는 방식으로 진행되었다.

## 결 과

### 1. Efficient offset

#### 1) 흡광도 측정

*A.a*에 인가하는 구형파 양전압의 offset이 흡광도에 미치는 영향을 평가하기 위한 시험을 먼저 진행하였다. Offset 전압을 0.4 V, 0.7 V, 0.8 V, 1.15 V로 설정하고 *A.a*에 7.83 Hz, 5.3V의 배지전압을 1시간 동안 인가하였다. 이 후 6시간 동안에 걸쳐서 흡광도를 비교한 결과, offset 0.7 V의 조건에서 가장 낮은 흡광도를 보였다 (Figure 4).

Offset을 부여하여 양전압으로 일정하게 전압을 인가한 것의 세균증식 억제 효과를 실험하기 위해 흡광도가 가장 낮은 결과를 보였던 offset 0.7 V와 offset을 zero

voltage 설정한 것을 비교하였다. 배지전압 6.5 V, 주파수 7.83 Hz의 구형파 양전압을 1시간 동안 인가할 때 offset을 zero voltage로 한 경우와 0.7 V로 한 경우에서 경과시간에 따르는 흡광도를 비교한 결과이다. 흡광도가 0.20 이상으로 상승하는 시점이 무처리 대조군에서는 약 2시간이 경과되었지만 offset zero voltage 그룹에서는 3시간, 그리고 offset 0.7 V 그룹에서는 6시간이 경과되도록 0.20 이하를 보였다(Figure 5).

### 2) HR FE-SEM

Figure 6은 배지전압 6.5 V, 주파수 7.83 Hz의 구형파 양전압을 1시간 동안 인가한 후 HR FE-SEM으로 관찰한 이미지로서, offset voltage 0.7 V 인가군이 나머지 실험군들에 비하여 낮은 세균수를 보였다.

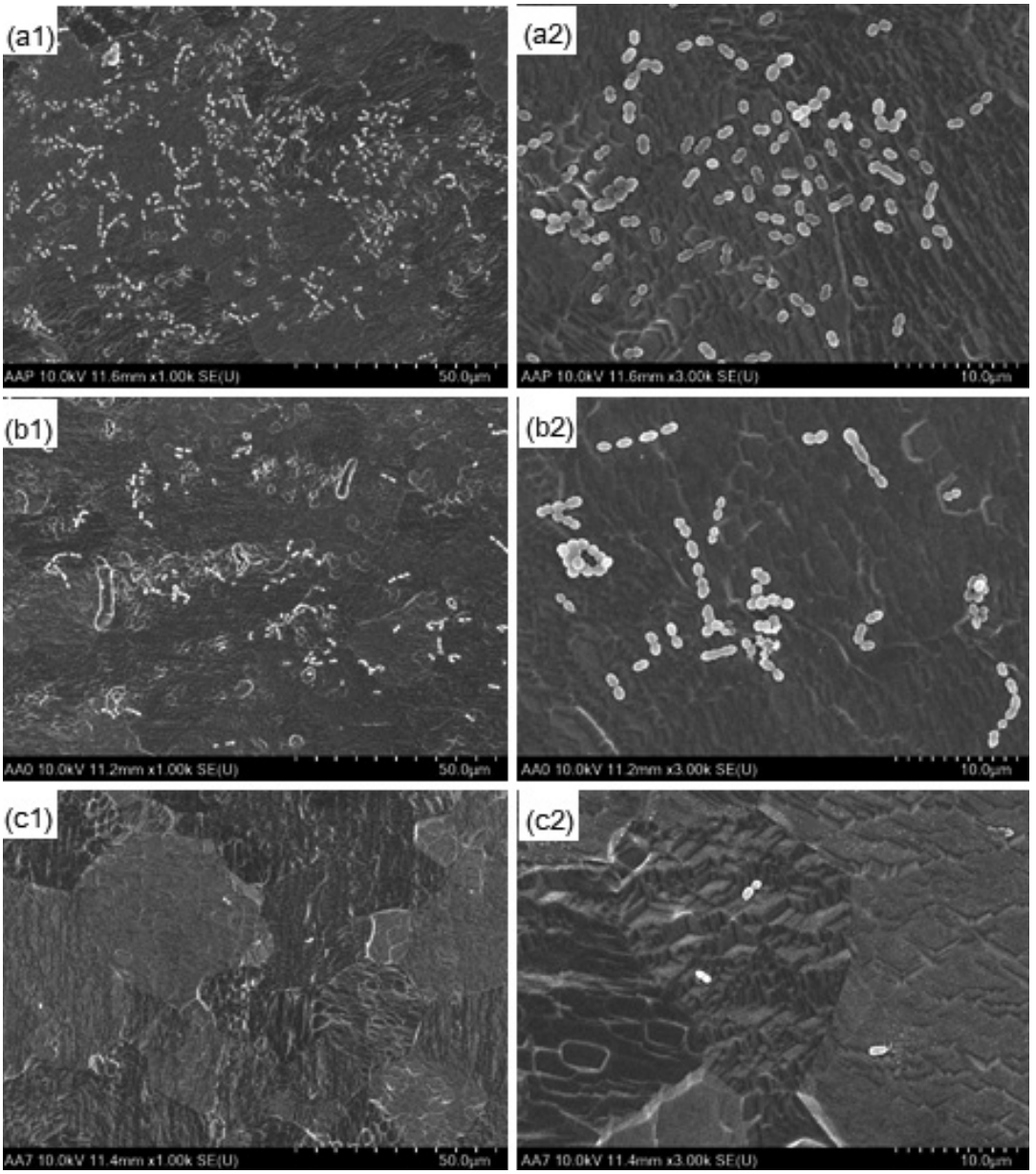


**Figure 6.** Images observed after culturing 100 μl bacterial solution for one hour with positive square wave voltage of frequency 7.83 Hz and Broth voltage 6.5 V under untreated control group (a1, a2) and conditions with offset 0 V (b1, b2) and offset 0.7 V (c1, c2) for four hours in a 37 ° C, 5% $CO_2$ incubator.

### 3) Conoly forming unit

Figure 7는 무처리 대조군(UT), offset zero V 그룹과 offset 0.7 V 그룹에 대하여 배지전압 6.5 V, 주파수 7.83 Hz의 구형파 양전압을 1시간 동안 인가하고서 24시간 후 CFU를 조사한 결과로서, 세균수는 offset 0.7 V 그룹에서 통계학적으로 유의하게 가장 낮게 나타났다 ($P < 0.01$).

## 2. Efficient frequency

### 1) 흡광도 측정

다음은 *A.a*에 주파수를 4 Hz, 6 Hz, 7.83 Hz, 12.5 Hz, 396 Hz로 달리하며 offset 0.7 V, 배지전압 5.3 V를 1시간동안 인가하고서 6시간 동안에 걸쳐서 흡광도를 비교한 결과, 4 Hz와 7.83 Hz에서 공히 흡광도 0.15 이하를 유지하였지만 그 이외에서는 주파수가 증가됨에 따라 흡광도가 증가하는 양상을 보였다(Figure 8). 세균의 증식 억제에 적절한 최적의 주파수를 찾기 위해 주파수를 4 Hz와 7.83 Hz로 고정하고 *A.a*에 배지전압을 4 V, 5.3 V 및 6.5 V로 1시간 동안 인가하고서 6시간 동안에 걸쳐서 흡광도를 비교한 결과, 주파수 7.83 Hz 그리고 배지전압 5.3 V 이상의 조건에서 흡광도 0.20 이하를 보여 *A.a*의 증식이 억제되는 결과를 보였다(Figure 8, 9).

## 3. Efficient voltage

### 1) 흡광도 측정

Offset 0.7 V, 주파수 7.83 Hz의 조건에서 배지전압이 세균 증식 억제에 미치는 영향을 평가하기 위한 시험을 진행하였다. Figure 10은 offset 0.7 V, 주파수 7.83 Hz 그룹에 대하여 배지전압을 2.7 V, 4.0 V, 5.3 V, 6.5 V로 변화시키며 1시간 동안 인가하고서 경과시간에 따르는

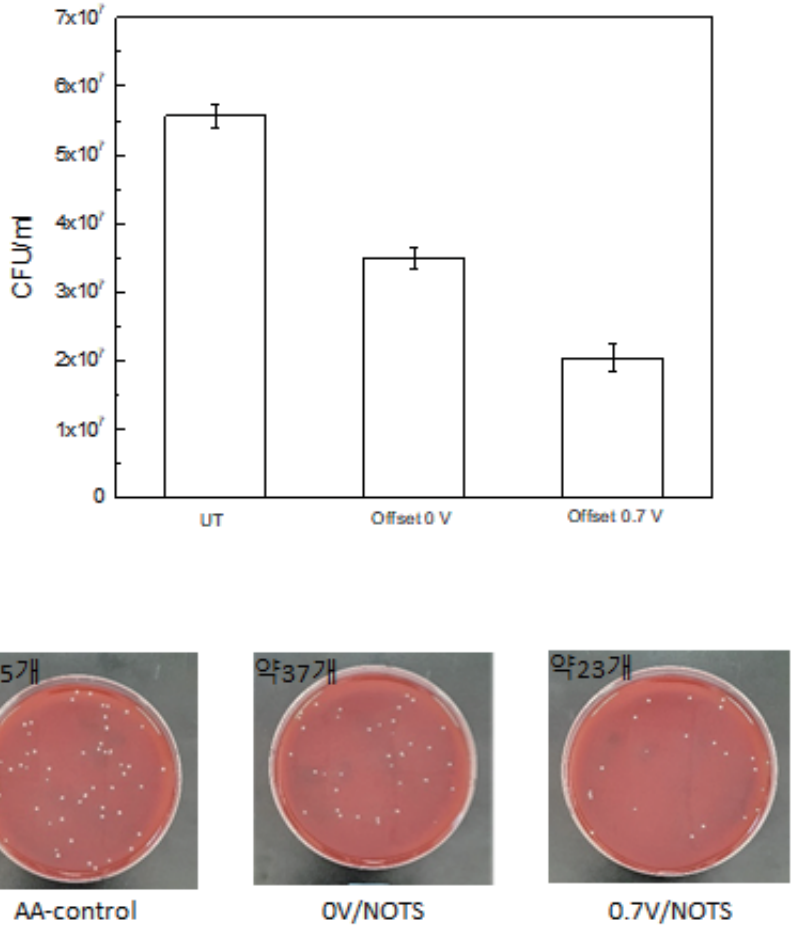


**Figure 7.** The colony-forming unit (CFU) results examined 24 hours after applying positive square wave voltage with an offset of 0.7 V, a Broth voltage of 6.5 V, and a frequency of 7.83 Hz for one hour($P < 0.01$).

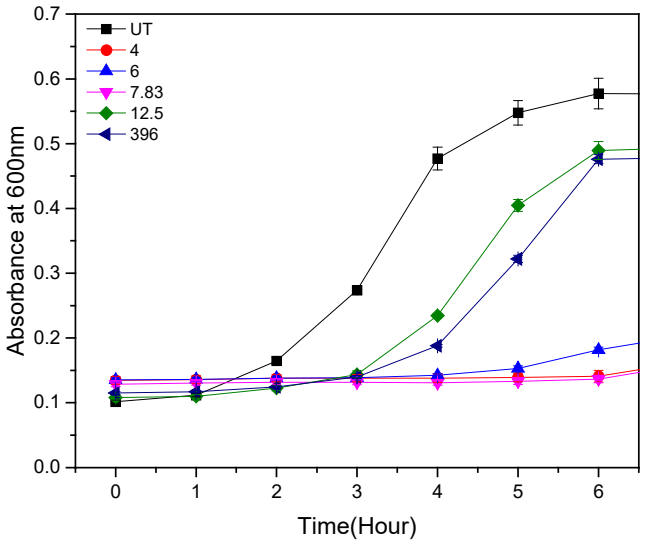


**Figure 8.** Absorbance changes when applying a broth voltage of 5.3 V with an offset of 0.7 V to *A.a* for one hour at frequencies of 4 Hz, 6 Hz, 7.83 Hz, 12.5 Hz, and 396 Hz.

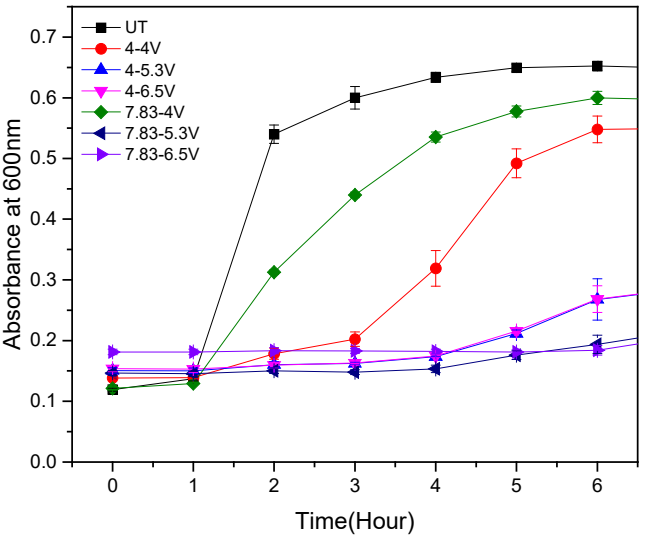


**Figure 9.** Absorbance changes when applying a Broth voltage of 4V, 5.3V, and 6.5V with an offset of 0.7V to *A.a* for one hour at frequencies of 4 Hz and 7.83 Hz. (UT: Untreated Control Group)

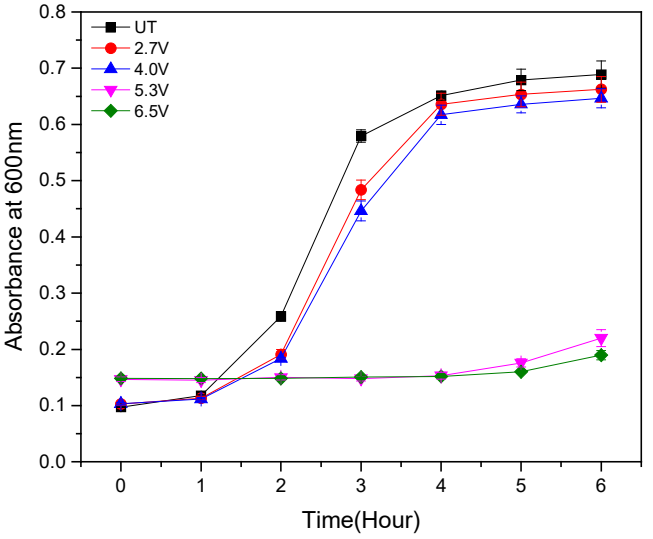


**Figure 10.** Absorbance changes when applying positive square wave voltage with an offset of 0.7V and a frequency of 7.83 Hz, with Broth voltages ranging from 2.7V to 6.5V for one hour. (UT: Untreated Control Group)

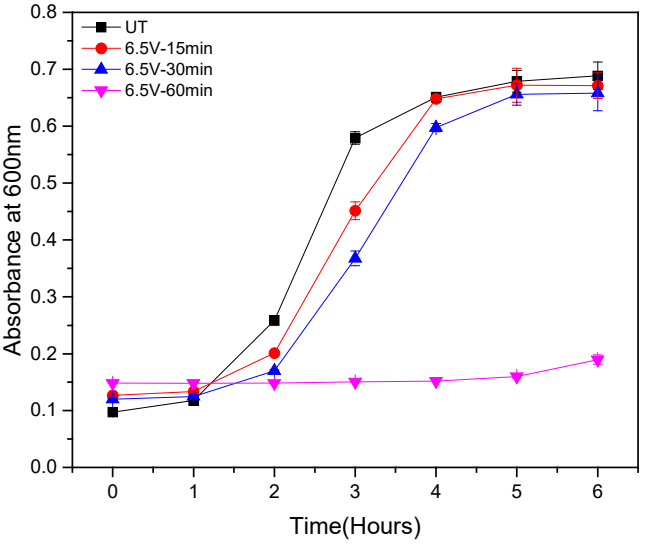


**Figure 11.** Absorbance changes over time when applying positive square wave voltage with an offset of 0.7V, frequency of 7.83 Hz, and a broth voltage of 6.5V for 15 minutes, 30 minutes, and 60 minutes. (UT: Untreated Control Group)

흡광도의 변화를 조사한 것이다. 세포배양 6시간 후의 흡광도는 무처리 대조군에서는 0.70에 달하였지만 전기처리군에서는 전압이 상승함에 따라 흡광도가 저하되는 경향을 보였다. 6시간 후의 흡광도에서 0.20 이하를 유지한 그룹은 5.3 V와 6.5 V이다.

## 4. Efficient application time

### 1) 흡광도 측정

또한, 구형파 양전압을 인가하는 시간에 따른 효과에 대하여 조사하였다. Figure 11은 offset 0.7 V 그룹에 대하여 배지전압 6.5 V, 주파수 7.83 Hz의 구형파 양전압

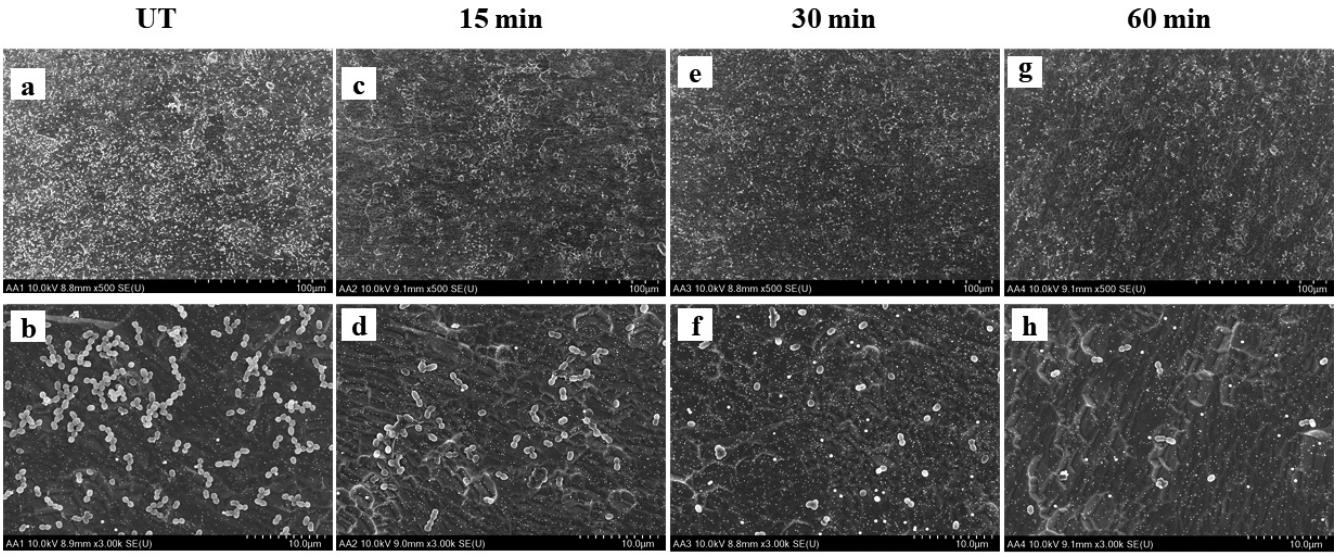


**Figure 12.** Images observed 24 hours after applying positive square wave voltage with an offset of 0.7 V, frequency of 7.83 Hz, and a broth voltage of 6.5 V for 15 minutes, 30 minutes, and 60 minutes. (a) UT (Untreated Control Group), (b) 15 min, (c) 30 min, (d) 60 min.

을 15분, 30분 및 60분 동안 인가하고서 경과시간에 따르는 흡광도의 변화를 조사한 것으로서, 전압을 인가한 시간이 길어짐에 따라서 흡광도는 저하되었다.

### 2) HR-FE SEM

Figure 12는 무처리 대조군(UT), offset 0.7 V 그룹에 대하여 배지전압 6.5 V, 주파수 7.83 Hz의 구형파 양전압을 15분, 30분 및 60분 동안 인가하고서 24시간 후 HR FE-SEM으로 관찰한 이미지이다. *A.a*는 전압의 인가시간이 60분으로 길어짐에 따라 세균수가 현저하게 저하되는 양상을 보였다.

## 고 찰

*Aggrigatibacter actinomycetemcomitans*는 혐기성, 비운동성의 작은 그람 음성 간균이다(10). 이 균주는 주변 공기에서는 성장이 원활하지 않지만 5% 이산화탄소(CO2) 환경에서는 성장이 잘 이루어진다(11). 본 논문에서도 *A.a*를 동정하기 위한 배지의 조건을 5% $CO_2$로 설정하여 성장을 관찰하였다. 이 균주는 전치와 구치부에 급격한 골소실을 보이는 국소적 급진성 치주염의 90%에서 관찰되며, 심한 성인 치주염에서 30~50%정도 발견된다(12). 또한, 연조직 농양, 골수염, 심내막염은 *A.a*와 관련된 비구강 감염이며, 그 중에서도 심내막염은 가장 흔히 연관된다(13). 본 논문에서는 급격한 골소실을 동반하는 치주염의 원인균인 *A.a*를 대상으로 저주기 구형파의 세균 증식 억제 효과를 평가하기 위해 실험을 진행하였다.

전자기적 영역에서 극저주파수(extremely low frequency: ELF) 범위의 전자기파는 생물체에 영향을 미치므로 의학, 생물학 및 환경과학 분야에서 관심을 받고 있으며, 이러한 ELF를 이용하여 세균을 소멸시키려는 연구는 지속적으로 진행되어 왔다(1). Sule Oncul 등은 ELF는 그람음성균과 그람양성균의 모두에 생화학적 변화를 일으켰으며, 약간의 분화 억제가 일어나는 것을 실험을 통해 보여주었다(4). Ayse Inhan-Garip 등은 50 Hz에서 세 종의 그람음성균, 세 종의 그람양성균에 ELF 인가 시 모든 실험군에서 유의미한 세균의 증식 억제가 일어났다고 하였다(14). 지금까지 치주질환의 추정 원인균인 *A.a*에 전압을 인가한 연구는 없었다. 본 연구의 결과, 그람 음성균인 *A.a*에 저주기 구형파 양전압을 2.7~6.5 V 범위에서 인가하며 offset 전압, 주파수 및 전

압의 인가시간의 영향에 대하여 조사한 결과, 전압의 인가 후 세균의 증식이 일정한 시간 동안 억제되는 결과를 보여 본 연구의 귀무가설은 기각되었다.

본 연구에서는 주파수 7.83 Hz와 최대 배지전압 6.5 V의 범위에서 시험을 진행하였다. 시험에 사용한 제너레이터는 출력전압 20 V에서 배지전압 6.5 V를 나타냈다. 이는 시험에 사용한 기기의 출력 저항이 약 1 KΩ임을 의미한다.

구형파 형태의 전압은 적용된 자기장의 세기를 일정하게 유지할 수 있도록 해준다(15). B. Del Re에 의하면, 50 Hz의 ELF-EMF를 가한 E. coli 세포의 생존률은 사인파에 노출된 경우에는 대조군보다 높았지만 구형파에 노출된 경우에는 대조군보다 유의하게 낮았다. 이러한 결과는 전자기장의 생물학적 영향은 파형과 같은 물리적 특성에도 크게 의존할 수 있음을 시사한다(16). 따라서 본 시험에서는 세균에 대한 전압 인가 시 세포 생존율의 저하에 더 크게 영향을 미치는 구형파 양전압을 선택하였다.

본 실험에서는 음전압을 배제한 상태에서 양전압을 지속적으로 가하기 위해 offset을 부여한 실험을 진행하였다. offset을 달리하여 진행한 실험에서는 배지전압을 5.3 V로 설정하였다. 이는 5.3 V 보다 높은 배지전압 인가 시 강한 전압으로 인하여 각각의 설정한 offset 간의 차이를 명확하게 나타나지 못할 수 있기 때문이다. 해당 실험에서 설정한 offset 0.4 V, 0.7 V, 0.8 V 및 1.15 V 중 0.7 V에서 가장 낮은 흡광도를 보였으므로 이후 모든 시험에서 offset을 0.7 V로 설정하였다.

ELF-EMF 범위에서 구형파 양전압을 세균에 인가할 때 주파수가 미치는 영향을 알아보기 위한 시험에서는 4 Hz와 7.83 Hz에서 유의미하게 낮은 흡광도를 보였다(Figure 5). 이후 전압을 달리하며 진행한 추가적인 시험에서 주파수 7.83 Hz 그리고 배지전압 5.3 V 이상의 조건에서 6시간 이상에 걸쳐서 흡광도 0.20 이하를 보여 *A.a*의 증식이 억제되는 결과를 보였다(Figure 6). 본 실험에서 설정한 7.83 Hz는 Schumann 주파수이다. Schumann 주파수는 지구 표면과 이온권의 진동으로 인해 발생하는 자연적인 전자기 공명으로서 기본 주파수는 평균 7.83 Hz이다(17). 이러한 Schumann 주파수의 ELF가 가지는 생물학적 효과에 대해서는 다양한 문헌이 존재한다. Tang 등은 7.83 Hz의 Schumann 주파수와 낮은 강도의 ELF-EMF가 결합하여 B16F10 암 세포의 성장을 억제할 수 있음을 보여주었다(18). Cherry 등은 Schumann 주파수를 인간의 뇌가 감지하고 멜라토닌/세로토닌 사이클 균형을 변경하는 것을 입증하였다(19). Schumann 주파수의 ELF가 생물학적 효과를 발휘한다는 것은 명백하지만, 박테리아에 적용한 문헌은 많지 않다. 본 연구는 *A.a*를 지구의 자연적인 전자기 공명인 7.83 Hz의 주파수와 5.3 V 이상에 1시간 동안 노출하는 경우, 세균의 증식이 6시간 이상에 걸쳐서 유의미하게 억제되는 결과를 보였다. 이는 10 Hz 미만의 저주파에서 세균의 증식을 억제할 수 있음을 시사한다.

배지전압 6.5 V, 주파수 7.83 Hz의 구형파 양전압을 1시간 동안 *A.a*에 인가했을 때, 대조군, offset 0 V 군, offset 0.7 V 군의 경우 흡광도 0.20에 도달하기까지 각각 1.2시간, 2.4시간 6.5시간이 걸렸다(Figure 7). 이는 대조군과 offset 0 V에 비해 offset 0.7 V의 경우가 세균의 증식 억제에 더욱 효과적임을 의미하며, 이러한 결과는 CFU 결과는 물론 HR FE-SEM 결과에서도 확인이 되었다(Figure 8, Figure 9). 이는 offset을 부여하는 경우, 즉 양전압을 지속적으로 인가하는 것이 *A.a* 성장 억제에 더 효과적임을 뜻한다. 또한 offset 0.7 V와 주파수 7.83 Hz 조건에서 배지전압을 2.7 V, 4.0 V, 5.3 V, 6.5 V로 변화시켰을 때는 전압이 높아질수록 흡광도가 저하되는 경향을 보였으며(Figure 10), 배지전압 5.3 V와 6.5 V에서는 6시간 동안 흡광도 0.20 이하를 나타내어 장시간의 세균 성장 억제를 위해서는 일정 수준 이상의 전압 인가가 필요할 것으로 보인다.

또한 offset 0.7 V에서 배지전압 6.5 V, 주파수 7.83 Hz 조건에서 전압의 인가시간의 영향을 조사한 경우 인가시간이 길어질수록 어 오랜 기간동안 세균의 증식이 억제되었다(Figure 11, 12). Ludek 의 연구에서는 *E.Coli*에 50 Hz의 ELF-EMF를 가하였을 때, CFU는 노출시간에 따라 감소하는 것으로 나타났다(20). Ece Bayir는 *E. Coli*와 *S. aureus*에 20, 40, 50 Hz의 ELF-EMF를 1, 2, 4, 6시간 인가하였을 때, 노출시간이 길

어짐에 따라 세균의 증식속도의 감소를 보였다(21). Fojt(2004)가 50 Hz, 10 mT의 ELF-EMF를 *E. coli*, *L. adecarboxylata*, *S. aureus*에 인가하였을 때, 전압의 인가시간이 증가함에 따라 CFU는 감소되었다(22). 본 연구에서 배지전압 6.5 V, 주파수 7.83 Hz 조건에서 저주기 구형파 양전압을 인가한 경우 실험군 중 15분과 30분 인가한 그룹에서는 6시간 후 대조군과 유사한 수준의 흡광도를 보였다. 하지만 저주기 구형파 양전압을 60분 인가한 그룹에서는 6시간 경과시까지 유의미하게 낮은 수준의 흡광도를 보였다. 따라서 구형파 양전압에 의하여 세균의 증식 억제 효과를 얻기 위해서는 1시간 이상의 전압 인가가 필요함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 실제 임상에서 구형파 양전압의 인가에 의한 세균 증식의 억제를 기대하기 위해서는 적어도 1시간 이상이 소요될 수 있음을 의미하며, 전압의 인가시간의 감소와 더 우수한 세균의 증식 억제 효과를 얻기 위해서는 시험 방법에 대한 추가적인 검토가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 관찰한 그람 음성균인 *A.a*의 증식 억제와 세균의 형태학적 변화는 ELF-EMF 적용에 따른 대사적 변화로 인한 것으로 추측할 수 있다. Inhan-Garip(2011)은 50 Hz, 0.5 mT의 전자기장을 6종의 박테리아 균주에 인가한 실험에서 TEM을 이용한 형태학적 변화를 분석을 한 경우, 세포벽의 분해 및 세포질 내용물의 배출 등의 결과를 보였다고 하였다(14). Fadel에 의하면 장티푸스 살모넬라(*Salm. typhi*)에 가한 ELF-EMF는 단백질 합성의 구조적 특성에 변화를 일으켰고, 이는 미생물의 대사활동 및 세포 간 통신에 영향을 줄 수 있다는 결론을 내렸다(23). 따라서 ELF-EMF가 세포막의 구성 요소를 변경하여 구조를 손상시키고, 단백질 합성 과정에 영향을 끼쳐서 박테리아 세포의 증식 억제를 유발한 것으로 추측 가능하다. 하지만 본 연구에서는 *A.a*의 어떤 기전으로 인하여 증식 억제가 일어났는 지는 확실하지 않다. 따라서 *A.a*에 ELF-EMF를 가하였을 때의 세균의 형태학적 변화에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

ELF-EMF의 생물학적인 효과는 적용하는 세포의 유형, 인가하는 전압의 주파수와 노출 시간에 따라 상이하다(14). 본 연구에서는 *A.a*에 offset 0.7 V, 배지전압 6.5 V 및 주파수 7.83 Hz 조건에서 구형파 전압을 1시간 동안 인가하였을 때 세균의 증식이 가장 효과적으로 억제되었다. *A.a*의 증식 억제에 가장 적합한 전압과 시간에 대한 자료를 얻기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

본 연구에서는 배지전압 최대 6.5 V로 출력되는 구형파 양전압을 사용하여 *A.a* 세균의 성장 감소에 대한 실험을 수행하였다 실험 결과, offset은 0.7 V에서, 주파수는 7.83 Hz에서 가장 효과적인 세균 성장 감소 효과가 나타났으며, 시간이 증가함과 전압이 증가함에 따라 더 높은 세균 성장 감소를 관찰할 수 있었다. 이와 함께, 본 연구에서는 ELF-EMF의 생물학적 효과를 연구하기 위해 Schumann 주파수를 선택하였다. 이 주파수를 사용하여 *A.a* 세균의 성장을 억제할 수 있음을 확인하였다. 또한, 10 Hz 미만의 저주파에서도 세균 성장을 억제할 수 있다는 결론을 도출하였다.

본 연구 결과는 *A.a* 세균의 성장을 억제하기 위해 ELF-EMF의 적절한 주파수와 전압이 필요하며, 더 많은 연구가 필요함을 시사한다. 또한, 세균의 형태학적 변화와 ELF-EMF 적용에 따른 대사적 변화 등의 메커니즘에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 종합적으로, 본 연구는 ELF-EMF의 주파수, 전압 설정, 인가 시간이 *A.a* 세균의 성장 감소에 유의미한 영향을 미침을 실험적으로 입증하였으며, ELF-EMF의 생물학적 효과를 이해하고 응용하기 위한 추가적인 연구의 필요성을 제시하였다.

## 사 사

본 연구는 ㈜하스의 지원으로 연구되었다.

## 참고문헌


1. Garip A, Akan Z. Effect of ELF-EMF on number of apoptotic cells; correlation with reactive oxygen species and HSP. Acta Biologica Hungarica. 2010;61(2):158-67.
2. Lacy-hulbert A, Metcalfe JC, Hesketh R. Biological responses to electromagnetic fields 1. The FASEB Journal. 1998;12(6):395-420.
3. Yalçın S, Erdem G. Biological effects of electromagnetic fields. African journal of biotechnology. 2012;11 (17):3933-41.
4. Oncul S, Cuce EM, Aksu B, Inhan Garip A. Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on bacterial membrane. International journal of radiation biology. 2016;92(1):42-9.
5. Costerton JW, Ellis B, Lam K, Johnson F, Khoury AE. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1994;38(12):2803-9.
6. Del Pozo J, Rouse M, Patel R. Bioelectric effect and bacterial biofilms. A systematic review. The International journal of artificial organs. 2008;31(9):786-95.
7. Lee J-H, Ha J-H. Bioelectric Effect of a Microcurrent Toothbrush on Plaque Removal. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021;18(16):8255.
8. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Advances in dental research. 1994;8(2):263-71.
9. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr R. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of clinical periodontology. 1998;25(2):134-44.
10. Nørskov-Lauritsen N, Claesson R, Jensen AB, Åberg CH, Haubek D. Aggregatibacter actinomycetemcomitans: Clinical significance of a pathobiont subjected to ample changes in classification and nomenclature. Pathogens. 2019;8(4):243.
11. Holm P. The Influence of Carbon-Dioxide on the Growth of Actinobacillus Actinomycetemcomitans (Bacterium actinomycetem comitans (Klinger 1912)). Acta pathologica et microbiologica scandinavica. 1954;34(3):235-48.
12. Raja M, Ummer F, Dhivakar C. Aggregatibacter actinomycetemcomitans–a tooth killer? Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. 2014;8(8):ZE13.
13. Van Winkelhoff AJ, Slots J. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in nonoral infections. Periodontology 2000. 1999;20(1):122-35.
14. Inhan-Garip A, Aksu B, Akan Z, Akakin D, Ozaydin AN, San T. Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on growth rate and morphology of bacteria. International journal of radiation biology. 2011; 87(12):1155-61.
15. Aarholt E, Flinn E, Smith C. Effects of low-frequency magnetic fields on bacterial growth rate. Physics in Medicine & Biology. 1981;26(4):613.
16. Del Re B, Bersani F, Agostini C, Mesirca P, Giorgi G. Various effects on transposition activity and survival of Escherichia coli cells due to different ELF-MF signals. Radiation and environmental biophysics. 2004;43:265-70.
17. Danho S, Schoellhorn W, Aclan M, editors. Innovative technical implementation of the Schumann resonances and its influence on organisms and biological cells. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering; 2019: IOP Publishing.
18. Tang J-Y, Yeh T-W, Huang Y-T, Wang M-H, Jang L-S. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on B16F10 cancer cells. Electromagnetic biology and medicine. 2019;38(2):149-57.
19. Cherry NJ. Human intelligence: the brain, an electromagnetic system synchronised by the Schumann resonance signal. Medical Hypotheses. 2003;60(6):843-4.

20. Strašák L, Vetterl Vr, Šmarda J. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria Escherichia coli. Bioelectrochemistry. 2002;55(1-2):161-4.
21. Bayır E, Bilgi E, Şendemir-Ürkmez A, Hameş-Kocabaş EE. The effects of different intensities, frequencies and exposure times of extremely low-frequency electromagnetic fields on the growth of Staphylococcus aureus and Escherichia coli O157: H7. Electromagnetic biology and medicine. 2015;34(1):14-8.
22. Fojt L, Strašák L, Vetterl Vr, Šmarda J. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria Escherichia coli, Leclercia adecarboxylata and Staphylococcus aureus. Bioelectrochemistry. 2004;63(1-2):337-41.
23. Fadel M, Mohamed S, Abdelbacki A, El-Sharkawy A. Inhibition of Salmonella typhi growth using extremely low frequency electromagnetic (ELF-EM) waves at resonance frequency. Journal of applied Microbiology. 2014;117(2):358-65.

Original Article

# 저주기 구형파 양전압의 인가가 치주 추정 병원균 *Aggregatibactor actinomycetemcomitans*의 동정에 미치는 영향

김화목[1], 박정환[1], 전영미[1], 김정기[1], 장용석[2], 이민호[2], 배태성[2,*]

[1]전북대학교 치과대학 치과교정학교실 및 구강생체과학연구소
[2]전북대학교 치과대학 치과생체재료학교실, 생체흡수성소재연구소 및 구강생체과학연구소

극저주파 전자기장(Extremely low frequency-electromagentic field, ELF-EMF)은 0~300 Hz의 주파수 범위를 갖는 전자기장을 의미한다. 일정 강도의 ELF-EMF에 노출된 세균의 세포막에는 구조적 변화가 관찰되었다. 이는 ELF-EMF가 세균의 세포막에 직접적인 영향을 줄 수 있으며 이는 세균의 생존과 성장에 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사한다. 본 연구는 치주 질환의 원인 세균 중 하나인 *Aggregatibactor actinomycetemcomitans*에 저주기의 구형파 양전압을 가했을 때 효과를 조사하였다. 20 V 이하의 구형파 양전압이 0~300 Hz의 범위에서 *A. actinomycetemcomitans*에 60분 이하의 범위에서 가해졌다. 세균의 군집 변화는 흡광도 측정, 집락형성능(CFU/ml) 평가 및 고해상도 필드 방출 주사전자현미경(HR FE-SEM)을 통해 관찰되었다. 세균 성장 억제에 있어 가장 효과적인 오프셋과 주파수가 0.7 V와 7.83 Hz (Schumann 주파수)임 결과로 나타났다. 적용 시간이 증가하고 전압이 증가함에 따라 세균 성장 억제에 효과적이었다. 이러한 결과로 인해 세균 성장은 10 Hz 미만의 낮은 주파수에서도 억제될 수 있으며, ELF-EMF의 주파수, 전압 설정 및 노출 시간이 *A. actinomycetemcomitans*의 성장 억제에 중요한 영향을 미침이 실험적으로 입증되었다.

**색인단어 :** *A. actinomycetemcomitans*, 극저주파 전자기장, Schumann 주파수