



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2023년 2월  
박사학위 논문

한국인 구강에서 분리된  
*Capnocytophaga ochracea*와  
*Selenomonas sputigena*의  
동정 및 특성화

조선대학교 대학원

치의생명공학과

임 윤 경

한국인 구강에서 분리된  
*Capnocytophaga ochracea*와  
*Selenomonas sputigena*의  
동정 및 특성화

Identification and characterization of  
*Capnocytophaga ochracea* and *Selenomonas sputigena*  
isolated from Korean oral cavities

2023년 2월 24일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

임 윤 경

한국인 구강에서 분리된  
*Capnocytophaga ochracea*와  
*Selenomonas sputigena*의  
동정 및 특성화

지도교수 국 중 기

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2022년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

임 윤 경

## 임윤경의 박사학위 논문을 인준함

위원장 전남대학교 교수 강인철 인

위원 조선대학교 교수 방일수 인

위원 조선대학교 교수 장현선 인

위원 조선대학교 교수 안상건 인

위원 조선대학교 교수 국중기 인

2023년 1월

조선대학교 대학원

# 목 차

ABSTRACT .....	vi
I. 서 론 .....	1
II. 연구재료 및 방법 .....	6
1. 세균 및 세균배양 .....	6
2. 16S rDNA 염기서열의 계통발생학적 분석 .....	7
3. 전장 유전체 염기서열 결정 및 종-수준에서의 동정 .....	7
4. 형태학적 특성 분석 .....	8
5. 생화학적 특성 분석 .....	8
6. 세균 지방산 조성 분석 .....	10
7. 극성 지방 분석 .....	10
8. 퀴논 분석 .....	11
9. 최적 성장 조건 측정 .....	11
III. 연구 결과 .....	13
1. 16S rDNA 염기서열 상동성 검색 및 계통발생학적 분석 .....	13
2. 전장 유전체 염기서열 결정 및 종-수준에서의 동정 .....	13
3. 형태학적 특성 분석 .....	14
4. 생화학적 특성 분석 .....	14
5. 세균 지방산 조성, 극성 지방 및 퀴논 분석 .....	15
6. 최적 성장 조건 측정 .....	15
IV. 총괄 및 고안 .....	41

V. 결 론 ..... 48

VI. 참 고 문 헌 ..... 50

## 표 목 차

Table 1. Information of bacterial strains used in this study .....	6
Table 2. GenBank accession numbers of nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA genes (16S rDNAs) and genomes of bacterial strains used in this study .....	9
Table 3. Summary of sequence analysis of 16S ribosomal RNA genes of three strains of <i>Capnocytophaga ochracea</i> isolated from a Korean population .....	17
Table 4. Summary of sequence analysis of 16S ribosomal RNA genes of two strains of <i>Selenomonas sputigena</i> isolated from a Korean population .....	18
Table 5. Summary of whole genome sequences of five strains used in this study .....	21
Table 6. Summary of average nucleotide identity (ANI) analysis for three strains of <i>Capnocytophaga ochracea</i> isolated from a Korean population .....	22
Table 7. Summary of average nucleotide identity analysis (ANI) for two strains of <i>Selenomonas sputigena</i> isolated from a Korean population .....	23
Table 8. Summary of genome-to-genome distance (GGD) analysis for three strains of <i>Capnocytophaga ochracea</i> isolated from a Korean population .....	24
Table 9. Genome-to-genome distance (GGD) values for the strain of this study and each type strain of <i>Selenomonas</i> spp./others genus ·	25
Table 10. Summary of cell morphology observation .....	26
Table 11. Results of biochemical tests of five strains used in this study using API 20A kit .....	27
Table 12. Results of biochemical tests of five strains used in this study using	



RAPID ID 32 A kit .....	28
Table 13. Summary of biochemical characteristics of three strains of <i>Capnocytophaga ochracea</i> used in this study and type strains of <i>Capnocytophaga</i> spp. ....	29
Table 14. Summary of biochemical characteristics of two strains of <i>Selenomonas sputigena</i> used in this study and type strains of <i>Selenomonas</i> spp. ....	30
Table 15. Chemotaxonomic characteristics of three strains of <i>Capnocytophaga ochracea</i> used in this study and type strains of <i>Capnocytophaga</i> spp. ....	31
Table 16. Comparison of cellular fatty acid (CFA) contents of two strains of <i>Selenomonas sputigena</i> used in this study and type strains of <i>Selenomonas</i> spp. ....	32
Table 17. Summary of optimal growth conditions for strains used in this study .....	33

## 도 목 차

Fig. 1. Phylogenetic trees based on partial nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA genes of type strains of genus <i>Capnocytophaga</i> . ...	19
Fig. 2. Phylogenetic trees based on the partial nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA genes of type strains of <i>Selenomonas</i> spp. and closely related genus. ....	20
Fig. 3. Cell morphology observation. ....	34
Fig. 4. Two-dimensional thin-layer chromatography for analysis of polar lipids in study strains. ....	35
Fig. 5. Optimal growth conditions for <i>Capnocytophaga ochracea</i> KCOM 2191. (A) temperature, (B) pH, and (C) NaCl concentration. ....	36
Fig. 6. Optimal growth conditions for <i>Capnocytophaga ochracea</i> KCOM 2668. (A) temperature, (B) pH, and (C) NaCl concentration. ....	37
Fig. 7. Optimal growth conditions for <i>Capnocytophaga ochracea</i> KCOM 2812. (A) temperature, (B) pH, and (C) NaCl concentration. ....	38
Fig. 8. Optimal growth conditions for <i>Selenomonas sputigena</i> KCOM 1787. (A) temperature, (B) pH, and (C) NaCl concentration. ....	39
Fig. 9. Optimal growth conditions for <i>Selenomonas sputigena</i> KCOM 2046. (A) temperature, (B) pH, and (C) NaCl concentration. ....	40

## ABSTRACT

### Identification and characterization of *Capnocytophaga ochracea* and *Selenomonas sputigena* isolated from Korean oral cavities

Lim, Yun Kyong

Advisor : Prof. Joong-Ki Kook, D.D.S., Ph.D.

Department of Biodental Engineering,

Graduate School of Chosun University

**Background and objectives:** Three strains (KCOM 2191, KCOM 2668, and KCOM 2812) of *Capnocytophaga ochracea* and two strains (KCOM 1787 and KCOM 2046) of *Selenomonas sputigena* were isolated from a Korean population and deposited to the Korean Collection for Oral Microbiology. These strains were classified at the species level by comparing their 16S ribosomal RNA gene (16S rDNA) sequences. Considering that the gold standards for bacterial classification at the species level are 16S rDNA sequencing and digitalized DNA-DNA hybridization, average nucleotide identity (ANI) and genome-to-genome distance (GGD) analysis, based on whole genome sequence (WGS), it is not enough to classify them as *C. ochracea* or *S. sputigena* at the species-level. Therefore, the purpose of this study was to classify these strains at the species-level based on WGS and additionally investigate their morphological, biochemical, and chemotaxonomical characteristics.

**Methods:** WGSs of five strains were determined using PacBio RSII and/or Illumina platform. ANI and GGD analysis were used to classify them at the species-level. Cellular fatty acid (CFA) compositions of the five strains

were determined using MIDI/Hewlett Packard Microbial Identification System. Their polar lipids were analyzed using thin-layer chromatography. Their quinones were determined using high-performance liquid chromatography.

**Results:** As a result of determining WGSs of the five strains, all were determined as one contig. As a result of ANI analysis, KCOM 2191, KCOM 2668, and KCOM 2812 strains had ANI values above 96.3% with *C. ochracea* DSM 7271<sup>T</sup>, and KCOM 1787 and KCOM 2046 strains showed ANI values above 95.3% with *S. sputigena* ATCC 35185<sup>T</sup>. As a result of analysis of CFAs, KCOM 2191, KCOM 2668, and KCOM 2812 strains had the highest amount of iso-C15:0 at 57.9%, 67.2%, and 64.9%, respectively. This result was similar to that of the *C. ochracea* DSM 7271<sup>T</sup> (51.5%). Major CFAs of KCOM 1787 and KCOM 2046 were C14:0 DMA, C16:1 cis-7, C18:1 at 17.254, C17:1 cis-9/C17:2, and C15:2/UN 14.762 C15:2, which accounted for approximately 10 %. Major CFAs of *S. sputigena* ATCC 35185<sup>T</sup> were C14:0 DMA (35.6%), C15:0 (11.1%), and C11:0 (10.9%), different from the two strains used in this study. As a result of morphological characteristics, biochemical tests, and quinone analysis, it was found that the five strains used in this study had characteristics similar to those of each type strain.

**Conclusion:** Results indicate that KCOM 2191, KCOM 2668, and KCOM 2812 strains belong to *C. ochracea*, and KCOM 1787 and KCOM 2046 strains belong to *S. sputigena*. These strains could be used to study the pathogenesis of oral as well as systemic diseases dependent on *C. ochracea* and *S. sputigena*.

## 1. 서론

치주조직은 치아를 둘러싸고 있는 치은, 치조골, 치주인대, 백악질로 구성된 조직으로, 치아를 단단히 잡아주고 교합력에 대한 완충작용을 한다. 치주질환은 치주조직에 발생하는 염증성 질환으로 전 세계적으로 유병률이 높은 질병 중 하나이다(Kassebaum *et al.*, 2014).

치주질환은 미생물에 의해 치주조직에 발생하는 질환을 의미하며(Hajishengallis and Lamont, 2012), 진행 정도에 따라서 치은염과 치주염으로 구별할 수 있다. 치은염은 치은의 발적과 부종을 동반하지만, 올바른 잇솔질과 간단한 치면세마와 같은 간단한 구강 위생관리법으로 쉽게 회복할 수 있다. 그러나 조직의 염증반응이 심화되면, 치주낭이 깊어지고, 치조골의 파괴를 초래하는 치주염이 발생한다. 이러한 치주염을 치료하지 않고 방치하면, 치아를 지지하지 못하게 되고, 결국 치아 손실을 초래한다(Pihlstrom *et al.*, 2005; Löe *et al.*, 1986).

치주질환의 원인요인은 유전, 흡연, 음주, 당뇨병, 비만 및 대사증후군, 골다공증, 영양결핍, 스트레스, 면역억제 상태 등과 같은 전신적 원인과 치면세균막, 치열 및 교합 상태, 부적합 보철물 등과 같은 국소적 원인으로 분류할 수 있다(Genco and Borgnakke, 2013). 즉, 치주질환은 사람의 항상성이 무너짐과 구강 미생물에 의해 발생한다고 볼 수 있다. 이러한 치주질환의 원인인자 중에서 가장 주된 인자는 치은연하 치면세균막 내의 세균인 것으로 보고되었다(Pihlstrom *et al.*, 2005).

현재 사람의 구강에 존재하는 세균은 774종(species)이며, 이들 중, 58% 세균 종은 학명이 부여되었고, 16%는 배양은 되었지만, 아직 학명이 부여되지 않았으며, 26%는 아직 배양되지 않은 것으로 조사되었다(HOMD; Human Oral 14Microbiome Database, <https://homd.org/>). 이러한 세균 종 중 여러 분자 역학조사에서 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* 등이 건강한 부위보다는 치주질환이 발생한 부위의 치면세균막에서 더 높은 빈도를 차지한다는 결과를 토대로, 이들 세균 종들이 치주질환의 주요한 원인균 종이라고 보고되었다(Kook *et al.*, 2005; Lee

*et al.*, 2005; Paster *et al.*, 2001; Socransky *et al.*, 1998). 이러한 치주질환이 발생한 치아의 치면세균막에서 질환과 관련된 특정 세균 종을 찾으려는 접근법으로, 최근에는 치면세균막을 구성하는 전체 세균 종들을 하나의 사회(*community*)를 이루는 군집의 변화, 즉 *microbiome*(미생물군집)을 이루는 세균 종들의 종류 및 개체 수의 변화와 이에 대한 숙주의 방어 능력(면역 반응)에 의해 치주질환이 발생한다는 가설을 가지고, 치주질환의 주요 원인균 종을 찾아야 한다는 주장이 제기 되었다(Hajishengallis and Lamont, 2012; Lamont and Hajishengallis, 2015). 이러한 가설은, 치주질환의 주요한 원인균 종이로 생각되었던, *P. gingivalis*가 치주질환 병소에서 검출되지 않는 연구 결과(Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000a,b; Diaz *et al.*, 2006), 사람 구강 세균 총은 매우 다양하여 774 종의 세균 종이 사람의 구강에서 발견되었지만 개개인에는 약 200여 종만 검출되고 50여 종만이 모든 사람들에게서 발견되었다는 보고(Aas *et al.*, 2005), 그리고 치주질환이 진행되면서 치면세균막을 구성하는 세균 종의 조성(*composition*)이 변화된다는 것을 근거로 제시되었다(Hajishengallis and Lamont, 2012). 즉, 어느 하나의 개체에 의해 다른 개체들의 집락화와 독성이 증가하는 과정을 의미하는 *polymicrobial synergy* (다균종 시너지), 건강한 상태에서의 공생관계를 유지하는 세균군집이라하는 *symbiosis*(공생상태, 공생관계)에서 염증 반응을 야기하는 세균 종의 상대적인 빈도(*abundance*)의 변화를 초래하는 *dysbiosis*(불균형)와 이들 미생물군집의 변화를 제어할 수 있는 면역학적감시(*immunological surveillance*) 기능이 상실되었을 때 치주질환이 발생한다는 것이다(Hajishengallis and Lamont, 2012; Lamont and Hajishengallis, 2015; Hajishengallis *et al.*, 2021).

구강 세균은 치주질환에 의해 파괴된 치은의 혈관을 통하거나, 호흡에 의해 기도로 들어가거나, 침이나 음식과 함께 위를 통해 장으로 이동하여, 구강 외 조직에 집락화를 이루거나, 이들이 발생하는 세포외 독소, 내독소 등에 의해 아급성 세균성 심내막염 및 죽상동맥경화증(Lakio *et al.*, 2006), 류마티스 관절염(Wegner *et al.*, 2010), 알츠하이머병(Riviere *et al.*, 2002), 호흡기 감염 및 폐렴(Paju and Scannapieco, 2007), 조산 및 저체중아

출산(Offenbacher *et al.*, 2006), 결장직장암(Queen *et al.*, 2022), 당뇨병 및 인슐린 저항성(Preshaw *et al.*, 2012) 등의 다양한 전신질환과 관련성이 있는 것으로 보고되었다(Bui *et al.*, 2019; Han and Wang, 2013).

*Capnocytophaga* spp.는 방추형에서 막대 모양의 그람 음성 세균이며, 고형 배지의 단단한 표면을 미끄러지듯 이동할 수 있는 운동성(gliding) 집락을 형성하는 특성을 가지고 있다(Leadbetter *et al.*, 1979). 또한 혐기성 또는 호기성 조건에서 CO<sub>2</sub> (5–10% v/v)의 존재에 의존하여 성장하는 특성을 가지고 있다. ‘*Capnocytophaga*’ 라는 속명은 CO<sub>2</sub> 의존성이 있음을 의미하는 "capno-"와 유연성 및 글라이딩 운동성을 갖는 세균 속명 "*Cytophaga*"에서 유래한다(Leadbetter *et al.*, 1979). *Capnocytophaga* spp.는 현재 사람 구강에서 분리된 9종(*C. ochracea*, *C. sputigena*, *C. gingivalis*, *C. haemolytica*, *C. granulosa*, *C. leadbetteri*, *C. endodontalis*, *C. periodontitidis*, *C. blienii*), 개와 고양이의 구강에서 발견될 수 있는 인수공통 병원체 4종(*C. canimorsus*, *C. canis*, *C. cynodegmi*, *C. stomatis*) 및 고양이의 구강에서 분리된 1종(*C. felis*)이 보고되었다(List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <https://lpsn.dsmz.de/>; Leadbetter *et al.*, 1979; Yamamoto *et al.*, 1994; Frandsen *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021; Antezack *et al.*, 2021; Brenner *et al.*, 1989; Zangenah *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2020). *Capnocytophaga* spp.는 면역이 저하된 숙주와 면역이 저하되지 않은 숙주 모두에서 질병을 유발할 수 있는 것으로 보고되었다(Parenti and Snyderman 1985; Bonatti *et al.*, 2003). *Capnocytophaga* spp.는 면역력이 저하된 숙주에서 균혈증(Mantadakis *et al.*, 2003), 뇌농양(Wang *et al.*, 2007; Sabbatani *et al.*, 2004), 뇌수막염(Le Moal *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1996), 심내막염(Sandoe, 2004), 뼈 감염(Piau *et al.*, 2013), 용모막양막염(Felix *et al.*, 2019)을 포함한 다양한 구강 외 감염의 원인이 되는 기회감염성 세균이다. *Capnocytophaga* spp.는 또한 폐암 환자의 타액 미생물군을 정량적 PCR을 사용하여 조사한 결과 대조군과 비교하여 유의하게 더 높은 것으로 보고되었다(Yan *et al.*, 2015). 또한, *Capnocytophaga* spp.는 구강 내 β-lactamase를 생산하는 주요 세균 종 중 하나이며,

macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) 항생제에 대한 내성 유전자인 *erm(F)* 및 *erm(C)* 유전자도 가지고 있음이 보고되었다(Ehrmann, *et al.*, 2014).

*Selenomonas* spp.는 그람 음성의 절대 혐기성 세균으로, 초승달 모양(curved shape)을 가지고 있으며, 만곡된 부위에 편모가 하나 혹은 그 이상 붙어 있는 특징을 갖는 것으로 보고되었다(Lessel and Breed, 1954). *Selenomonas* spp.는 당질대사의 최종 산물로 주로 아세트산과 프로피온산을 생산하는 것으로 보고되었다(Johnson *et al.*, 1985). *Selenomonas* spp.는 현재 사람 구강에서 분리된 9종(*S. artemidis*, *S. diana*, *S. felix*, *S. flueggei*, *S. infelix*, *S. massiliensis*, *S. noxia*, *S. sputigena*, *S. timonae*), 반추동물의 위장관에서 분리된 3종(*S. bovis*, *S. montiformis*, *S. ruminantium*) 및 특정 환경에서 분리된 3종(*S. acidaminovorans*, *S. lactificex*, *S. lipolytica*)이 보고되었다(List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <https://lpsn.dsmz.de/>; Moore *et al.*, 1987; Kuete *et al.*, 2019; Belkacemi *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 1985; Antezack *et al.*, 2021; Zhang and Dong, 2009; Wylensek *et al.*, 2020; Bryant, 1956; Guangsheng *et al.*, 1992; Schleifer *et al.*, 1990; Dighe *et al.*, 1998).

치주질환의 발생기전을 이해하기 위해서는 사람 구강조직 세포와 세균 간의 상호작용 연구가 필수적이다. 일반적으로 숙주세포-세균 간 상호작용 연구에 있어서, 표준균주(type strain) 혹은 특정 참고균주(reference strain)를 포함한 소수의 균주들만을 이용한 연구들이 진행되고 있다(Ahn *et al.*, 2016; Scheres and Crielaard, 2013). 하지만, 최근의 연구결과에 의하면, 같은 세균 종에 속하는 균주들의 유전학적 다양성 (Avila-Campos *et al.*, 2006) 및 숙주세포와 다양한 반응을 하는 것으로 보고되었다(Kurgan *et al.*, 2017). 그러므로, 특정 세균 종의 구강조직 세포와의 상호작용 연구를 위해서는 다양한 균주들이 필요하다고 생각된다. 또한, 균주에 따른 숙주세포-세균 간 상호작용 연구결과를 분석하기 위해서는 각 균주들이 어떤 병원성 유전자를 가졌는지의 정보도 필요하다고 생각된다.

현재, 세균을 종-수준으로 동정하기 위한 황금 기준(gold standard)이 되는 분류학적 실험법은 16S ribosomal RNA gene (16S rDNA)의 염기서열



비교분석법(Stackebrandt and Goebel, 1994; Kim *et al.*, 2014)과 세균 전장 유전체 염기서열(whole genome sequence, WGS)의 상동성을 *in silico* 프로그램으로 비교분석하는 average nucleotide identity (ANI) 분석법(Goris *et al.*, 2007; Richter and Rossello, 2009; Lee *et al.*, 2016) 또는 genome-to-genome distance (GGD) 분석법(Meier-Kolthoff *et al.*, 2013; Chun *et al.*, 2018)이다. 특히 ANI 혹은 GGD 분석법은 차세대 핵산 염기서열결정법(next generation sequencing, NGS)의 발전에 의해, 기존의 물리적 방법에 의한 세균 전장 유전체 비교법인 DNA-DNA hybridization (DDH) 법을 대신할 수 있게 되었다. 이러한 의미에서 ANI와 GGD 분석법을 digitalized DDH법 이라고 한다. 세균 균주를 종-수준으로 정확히 동정하기 위해서는 16S rDNA 염기서열 비교분석법과 ANI 혹은 GGD 분석법을 통한 전장 유전체의 염기서열 상동성 분석법을 시행하여야 한다.

본 연구에서는 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, KCOM, Gwangju, Korea)에서 16S rDNA 염기서열 비교분석법만으로 *C. ochracea*로 동정된 3개 균주와 *S. sputigena*로 동정된 2개 균주를 분양받아, 이들의 전장 유전체 염기서열을 결정하고, ANI 및 GGD 분석법을 실행하여 종-수준으로 최종결정하고자 한다. 이와 더불어 본 연구는 이들 균주들의 형태학적 특성, 생화학적 특성, 지방산 조성 분석, 극성 지방 분석, 퀴논분석 및 최적 성장조건 측정을 통하여, 이들의 특성을 밝히기 위해 시행되었다. 향후 치주질환과의 관련성을 연구하는 병인론 연구 방법 중 하나인 숙주-세균 상호작용 연구에 이들 5개 균주를 이용할 수 있을 것이며, 균주 특성 정보는 결과를 해석하는 데 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 세균 및 세균배양

본 연구에 사용된 KCOM 2191, KCOM 2668, KCOM 2812, KCOM 1787, KCOM 2046 균주들은 한국구강미생물자원은행(Korea)에서 분양을 받았으며, 분리 정보는 Table 1에 정리하였다.

이들 균주들은 tryptic soy broth (TSB, BD Difco Laboratories, Spark, MD, USA)에 0.5% yeast extract, 5 µg/ml hemin, 0.05% cysteine HCl-H<sub>2</sub>O, 및 2 µg/ml vitamin K<sub>1</sub>이 포함된 배지를 사용하여 실험에 사용하였다. 다만, 이들의 최적 성장에 필요한 NaCl 농도를 결정하기 위한 실험에서만, trypticase peptone (BD Difco Laboratories, Spark, MD, USA)에 0.5% yeast extract, 0.25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25% glucose, 5 µg/ml hemin, 0.05% cysteine HCl-H<sub>2</sub>O 및 2 µg/ml vitamin K<sub>1</sub>이 포함된 배지를 사용하였다. 이들 균주들은 혐기성 조건(5% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>)과 37°C가 유지되는 혐기성 배양기(BACTRONEZ-2, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, Oregon, USA)에서 24-48시간 동안 배양하였다.

Table 1. Information of bacterial strains used in this study

Strains	Species	Subject ID	Gender	Age	Tooth site*	Source	Isolated date
KCOM 2191 (= ChDC A21)	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	YB 4-7	Female	43	#35	Subgingival dental plaque, gingivitis	2001. 12.10.
KCOM 2668 (= ChDC PV-A122)	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	PD 2-9, 10, 11, 12(47-2)	Female	NI	#47	Subgingival dental plaque, periimplantitis	2003. 09.29.
KCOM 2812 (= ChDC OSN10)	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	OFMS	Female	NI	NI	Actinomycosis	2006. 02.10.
KCOM 1787 (= ChDC B468)	<i>Seitenomonas sputigena</i>	OFMS 25	Male	NI	NI	Mandibular osteomyelitis	2002. 04.22.
KCOM 2046 (= ChDC B130)	<i>Seitenomonas sputigena</i>	YB 6-4	Male	38	#46	Subgingival dental plaque, gingivitis	2001. 11.23.

\*the Fédération Dentaire Internationale (FDI) system.

KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology; ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University; NI, no information.

## 2. 16S rDNA 염기서열의 계통발생학적 분석

본 연구에서 사용된 모든 균주들의 16S rDNA 염기서열은 GenBank 데이터베이스(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)에서 얻었으며, Table 2에 정리하였다. 이들의 상동성은 EzBioCloud 프로그램(<https://www.ezbiocloud.net/identify>)을 사용하여 검색하였다. 그 결과 각각의 균주들과 상동성이 91% 이상인 균주들의 표준균주들의 염기서열과 함께, MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) 프로그램을 이용한 계통분류학적 분석을 실시하였다. MEGA X의 Clustal W 법으로 분석하고자 하는 16S rDNA 염기서열을 정렬(alignment)하고, neighbor-joining methods (Saitou and Nei, 1987)을 이용하여 계통수(phylogenetic tree)를 얻었다. 이때 계통도의 신뢰도를 높이기 위해, bootstrap 값은 1,000회로 정하였으며, 비교 대상이 되는 균주들의 진화적 거리(% distance로 표현함)는 Kimura 2-parameter model을 이용하여 구하였다.

## 3. 전장 유전체 염기서열 결정 및 종-수준에서의 동정

본 연구에 사용된 균주들의 전장 유전체 염기서열을 결정하기 위해 Cho 등(2015)이 제시한 페놀:클로로포름 추출법을 시행하여 전장 유전체 DNA를 추출한 후, Macrogen 사(Seoul, Korea)에 의뢰하였다. PacBio RSII 및 Illumina platform을 이용하여 시퀀싱하고, RS HGAP 및 SPAdes 소프트웨어를 사용하여 assembly 되었으며, Genome annotation은 Prokka (<http://www.vicbioinformatics.com/software/prokka.shtml>)을 이용하여 수행되었다.

전장 유전체 염기서열을 이용한 종-수준에서의 동정을 위한 Average Nucleotide Identity (ANI) 분석은 ChunLab (Seoul, Korea)에서 제공하는 소프트웨어(<http://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)를 사용하여 시행하였으며, GGD (Genome-to-Genome Distance) 분석은 DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany)에서 제공하는 GGD calculator (GGDC) (<http://ggdc.dsmz.de>)를 사용하여 수행하였다. ANI 및 GGD 분석을 위한 균주의 전체 게놈 서열 및 GenBank accession number는 GenBank

데이터베이스(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>)에서 얻었으며, Table 2에 정리하였다.

#### 4. 형태학적 특성 분석

균주들의 자세한 모양 관찰과 크기를 측정하기 위하여 주사전자현미경(SEM, scanning electron microscopy) 검경을 시행하였다. 하루 동안 배양된 균액을 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 용액으로 실온에서 3시간 동안 전고정 처리 후, 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 용액으로 실온에서 40분 동안 후고정 처리하였다. 그 다음 50%, 70%, 80%, 90%, 100% ethanol을 단계적으로 처리하여 시료를 탈수한 후 hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)으로 화학적 건조를 하였다. 이렇게 전처리한 시료는 stub위에 부착시켜 sputter coater 안에 platinum으로 코팅하고 5kV에서 electron microscopy (S-4800, Hitachi, Tokyo, Japan)으로 검경 하였다.

또한 균주들의 집락 모양과 크기를 측정하기 위하여 한천배지에서 2일 동안 배양하여 실체현미경(ZEISS Stemi 305 Compact stereo microscope, Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) 검경을 시행하였다.

그람염색은 먼저 균주의 집락과 식염수를 섞어 슬라이드글라스 위에 도말하고 건조 후 화염 고정하여 준비하였다. crystal violet으로 1분, Lugol 용액으로 1분, alcohol 탈색 20초, safranin으로 30초간의 순서로 염색하였다(YD diagnostics CORP., Yongin, Korea). 물로 세척하고 건조 후 검경 하였다.

#### 5. 생화학적 특성 분석

혐기성 세균을 동정하기 위한 API 20 A 및 RAPID ID 32 A (bioMerieux, Marcy-l'Étoile, France)를 사용하여, 제조사의 지침에 따라 균주의 생화학적 특성, 효소 활성 및 당 발효 패턴을 분석하였다.

Table 2. GenBank accession numbers of nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA genes (16S rDNAs) and genomes of bacterial strains used in this study

Species and strain	GenBank accession numbers/location	
	16S rDNA	Genome
<i>Capnocytophaga ochracea</i> KCOM 2191	KX096270	CP110228
<i>Capnocytophaga ochracea</i> KCOM 2668	KX096336	CP110229
<i>Capnocytophaga ochracea</i> KCOM 2812	ON724177	CP110230
<i>Capnocytophaga endodontalis</i> ChDC 0S43 <sup>T</sup>	AF543293	CP022022
<i>Capnocytophaga leadbetteri</i> AHN8855 <sup>T</sup>	NR_043464	QBKG00000000
<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 <sup>T</sup>	NR_027581	CP001632
<i>Capnocytophaga periodontitidis</i> p1a2 <sup>T</sup>	MW341441	JAEFDB0000000000
<i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC 33612 <sup>T</sup>	NR_026095	ABZV0000000000
<i>Capnocytophaga bilanii</i> Marseille-Q4570 <sup>T</sup>	MW762958	JAGDYP0000000000
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i> DSM 19736 <sup>T</sup>	NR_043063	ARAI0000000000
<i>Capnocytophaga stomatis</i> H2177	CP022387/ 652387..653909	CP022387
<i>Capnocytophaga canimorsus</i> 7120 <sup>T</sup>	NR_043062	CP022382
<i>Capnocytophaga canis</i> CcD38 <sup>T</sup>	NR_146353	CD0100000000
<i>Capnocytophaga felis</i> KC07070 <sup>T</sup>	LC411961	BLBC0000000000
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> ATCC 33624 <sup>T</sup>	NR_026094	ACLQ0000000000
<i>Capnocytophaga granulosa</i> B0611 <sup>T</sup>	NR_044777	KE150261
<i>Capnocytophaga haemolytica</i> A0404 <sup>T</sup>	NR_029312	LT906449
<i>Selenomonas sputigena</i> KCOM 1787	MT299692	CP110383
<i>Selenomonas sputigena</i> KCOM 2046	ON799263	CP110231
<i>Selenomonas sputigena</i> ATCC 35185 <sup>T</sup>	NR_025115	CP002637
<i>Selenomonas montiformis</i> WCA-380-WT-3B3 <sup>T</sup>	MN537516	VUNL0000000000
<i>Selenomonas bovis</i> WG <sup>T</sup>	NR_044111	ARLB0000000000
<i>Selenomonas noxia</i> ATCC 43541 <sup>T</sup>	NR_028796	ACKT0000000000
<i>Selenomonas diana</i> ATCC 43527 <sup>T</sup>	NR_041805	-
<i>Selenomonas felix</i> Marseille-P3560 <sup>T</sup>	LT725659	FYCJ0000000000
<i>Selenomonas massiliensis</i> Marseille-P4036 <sup>T</sup>	LT970915	OLMJ0000000000
<i>Mitsuokella jalaludinii</i> M9 <sup>T</sup>	NR_028840	JNKR0000000000
<i>Centipeda periodontii</i> DSM 2778 <sup>T</sup>	NR_041950	AFHQ0000000000

## 6. 세균 지방산 조성 분석

균주들은 48시간 배양하여 균체를 모아 비누화, 메틸화시킨 후 fatty acid methyl ester (FAME)를 추출하였다. 세균 지방산은 제조업체의 지침에 따라 가스크로마토그래피(Model 6890N and Auto-sampler 7683; Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 분석되었고 MIDI/Hewlett Packard Microbial Identification System (MIDI, Microbial ID, Newark, USA)을 이용한 Sherlock™ 미생물 식별 시스템(버전 6.3)을 사용하여 동정 되었다. 이러한 세균 지방산 조성 분석은 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, Seoul, Korea)에 의뢰하여 실시하였다.

## 7. 극성 지방 분석

Minikin 등(1984)이 제시한 방법대로 균주들은 48시간 동안 배양하여 균체를 모아 동결건조한 후 methanol:0.3% NaCl (100:10) 용액과 hexane을 동량 첨가하고 혼합하였다. 잘 섞어진 혼합액을 원심분리 후 상층을 제거하고 다시 hexane을 첨가하여 잘 섞어준 후 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 남아있는 하층을 100℃에서 5분간 가열하고 37℃에서 5분 정도 식힌 후 Chloroform:methanol:0.3% NaCl (90:100:30)를 첨가하고 1시간 동안 교반하여 잘 섞어준 후 원심분리하여 상층액을 다른 tube에 옮겨 담았다. 남아있는 하층에 chloroform:methanol:0.3% NaCl (50:100:40) 용액을 첨가하고 30분 동안 교반하여 잘 섞어준 후 원심분리하여 상층액을 이전 상층액과 합하였다. 상층액에 chloroform과 0.3% NaCl 용액을 동량 첨가한 후 원심분리하여 상층을 제거한 하층 부분을 rotary evaporator에서 건조하였다. 최종적으로 증류수에 용해한 시료를 박층 크로마토그래피(TLC, Thin-layer chromatography)로 전개하여 분석하였다.

High-performance thin layer chromatography (HPTLC) silica gel plate (10cm×10cm, Merck, Darmstadt, Germany)에 시료를 spotting 한 후 건조하였다. chloroform:methanol:water (65:25:3.8) 용매 하에서 1차 전개한 후, plate를 건조시키고 chloroform:methanol:acetic acid:water (40:7.5:6:1.8) 용매 하에서 2차 전개를 하였다. 이때 standard plate와 시료 plate를 동시에 같은 조건으로

전개하였다. 전개가 끝난 plates는 hood 안에서 잘 건조 시킨 후 5% ethanolic molybdato-phosphoric acid (모든 지질 검출) 발색시약을 spray로 골고루 뿌려주고 100°C의 oven에 건조 시키고 스캔하여 결과를 확인하였다. 또한 0.2% ninhydrin (아미노 지질 검출), zinzadze (인지질 검출) 및  $\alpha$ -naphthol (2.4% (w/v)  $\alpha$ -naphthol in 10% (v/v) sulfuric acid, 80% (v/v) ethanol)(당지질 검출)의 발색시약을 사용하여 spray로 골고루 뿌려주고 100°C의 oven에 건조 시킨 후 스캔하여 결과를 확인하였다. 이러한 세균의 극성 지방 분석은 한국미생물보존센터(Korea)에 의뢰하여 실시하였다.

## 8. 퀴논 분석

세포막에 존재하는 isoprenoid quinone을 추출하기 위해 Shin 등(1995)이 제시한 방법을 이용하였다. 균주들을 48시간 동안 배양하여 균체를 모아 동결건조한 후, chloroform:methanol (2:1) 용액을 넣은 혼합액을 종이 여과지(110mm, NO. 2, Whatman, Kent, England)에 여과하였다. 여과된 용액은 농축한 후 Chloroform:methanol (8.5:1.5) 용액으로 녹이고 원심분리한 상등액을 시료로 고성능 액체 크로마토그래피(YOUNG LIN Co., YL9100 HPLC, Anyang, Korea) 분석을 하였다. HPLC 분석 컬럼은 Waters Spherisorb ODS2 Column, 5  $\mu$ m, 4.6 mm X 150 mm column을 사용하였으며 분석 용매는 methanol:isopropyl ether (4:1) 용액을 사용하여 1.0 ml/min 유속으로 254nm 파장에서 검출하였다. 이러한 퀴논 분석은 한국미생물보존센터(Korea)에 의뢰하여 실시하였다.

## 9. 최적 성장 조건 측정

최적 성장 온도를 조사하기 위해 25–45°C (5°C 간격) 조건에서 1일, 2일 및 3일 동안 액체 배양하여 Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 UV 600 nm 파장의 OD 값(Optical Density)을 측정하였다. 이때 blank로 세균을 넣지 않은 액체배지(pH 7.0, 0.5% NaCl)를 같은 조건으로 배양하였다.

최적 성장 수소이온농도를 조사하기 위해 pH 5-10 (pH 0.5 간격) 조건에서 1일, 2일 및 3일 동안 37°C에서 액체 배양하여 OD 값을 측정하였고, 이때 blank로 세균을 넣지 않은 액체배지(0.5% NaCl)를 같은 조건으로 배양하였다.

최적 성장 NaCl 농도를 조사하기 위해 0-2% (0.5% 간격) 농도에서 1일, 2일 및 3일 동안 37°C에서 액체 배양하여 OD 값을 측정하였다. 이때 blank로 세균을 넣지 않은 액체배지(pH 7.0)를 같은 조건으로 배양하였다.

각 실험군의 OD 값에서 blank의 OD 값을 뺀 수치를 각 실험군의 실질적인 성장 정도를 나타내는 값으로 삼았으며, 최적 성장 조건은 이 수치가 가장 높은 값의 것으로 결정하였다.



### III. 연구 결과

#### 1. 16S rDNA 염기서열 상동성 검색 및 계통발생학적 분석

EzBioCloud 프로그램을 사용하여 각 균주들의 16S rDNA 염기서열들의 상동성을 검색한 결과는 Table 3과 4에 정리하였다. KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주는 *Capnocytophaga ochracea* DSM 7271<sup>T</sup> 표준균주의 16S rDNA 염기서열과 가장 높은 상동성을 보였으며, KCOM 1787과 KCOM 2046 균주는 *Selenomonas sputigena* ATCC 35185<sup>T</sup> 표준균주의 16S rDNA 염기서열과 상동성이 가장 높았다.

이 균주들의 16S rDNA 염기서열의 진화론적 측면에서 가장 가까운 종을 알아보기 위한 계통수 분석결과, KCOM 2812와 KCOM 2191는 cluster(클러스터) CC-1-1에, KCOM 2668은 *C. ochracea* DSM 7271<sup>T</sup>와 함께 클러스터 CC-1-2에 속하였다(Fig. 1). 이들 4개 균주들은 클러스터 CC-1에 배열되었다(Fig. 1).

KCOM 2046과 KCOM 1787 균주들은 *S. sputigena* ATCC 35185<sup>T</sup>와 함께 클러스터 CS-1에 함께 배열되었다(Fig. 2).

#### 2. 전장 유전체 염기서열 결정 및 종-수준에서의 동정

본 연구에서 사용된 균주들의 전장 유전체 염기서열을 분석한 결과, KCOM 2191, KCOM 2668, KCOM 2812 균주들의 전장 유전체 크기는 2.67–2.80 Mb였으며, GC 함량은 39.3–39.7 mol%였다(Table 5). 또한, KCOM 1787과 KCOM 2046 균주의 전장 유전체 크기는 각각 약 2.61 Mb와 2.74 Mb이었으며, GC 함량은 56.9 mol%와 57.2 mol%였다(Table 5).

본 연구에서 사용된 5개 균주들의 전장 유전체 염기서열은 GenBank submission portal (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 업로드하였으며(Table 2), 분석 결과는 Table 5에 요약하였다.

전장 유전체 염기서열을 이용한 종-수준에서의 동정을 위한 ANI 분석결과 KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주는 *C. ochracea* DSM 7271<sup>T</sup> 표준균주와 약 96.3% 이상의 상동성을 보였으며(Table 6), KCOM 1787과 KCOM 2046 균주는

*S. sputigena* ATCC 35185<sup>T</sup> 표준균주와 95.3% 이상의 상동성을 보였다(Table 7).

그리고 GGD 분석 결과, KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주는 *C. ochracea* DSM 7271<sup>T</sup> 표준균주와 각각 66.0–67.9%의 상동성을 보였으며(Table 8), KCOM 1787과 KCOM 2046 균주는 *S. sputigena* ATCC 35185<sup>T</sup> 표준균주와 각각 61.6%, 63.7%의 상동성을 보였다(Table 9).

### 3. 형태학적 특성 분석

균주들의 자세한 모양 관찰과 크기를 측정하기 위하여 주사전자현미경 검경을 하고 균체의 길이를 측정한 결과를 Table 10에 정리하였다. KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들의 모양은 1–13  $\mu\text{m}$  되는 다양한 길이의 편모가 없는 방추형으로 *Capnocytophaga* spp.와 형태학적으로 일치하였다(Fig. 3A–3C). KCOM 1787과 KCOM 2046 균주들 또한 *Selenomonas* spp.의 특징인 초승달 모양과 만곡된 부위에 편모가 있는 형태가 관찰되었다(Fig. 3D와 3E).

균주들의 집락 모양과 크기를 측정하기 위하여 한천배지에서 2일 동안 배양하여 실체현미경으로 관찰한 결과를 Table 10에 정리하였다. KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들의 한천 배지에서 집락의 형태는 단단한 표면을 미끄러지듯 이동할 수 있는 gliding 운동성 집락을 형성하였다(Fig. 3A–3C). KCOM 1787과 KCOM 2046 균주들의 한천 배지에서 집락의 형태는 원형의 불룩하며, 불투명한 상아색으로 관찰되었다(Fig. 3D와 3E).

### 4. 생화학적 특성 분석

혐기성 세균을 동정하기 위한 API 20 A kit와 RAPID ID 32 A kit를 사용하여 균주의 생화학적 특성, 효소 활성 및 당 발효 패턴을 분석한 결과를 Table 11–14에 정리 하였다.

KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들 모두 alkaline phosphatase, alanine arylamidase, arginine arylamidase, glutamyl glutamic acid arylamidase, glycine arylamidase, histidine arylamidase, leucine arylamidase, leucyl glycine arylamidase, phenylalanine arylamidase, proline arylamidase, serine arylamidase, tyrosine arylamidase의 효소들이

존재하였고 esculin을 가수분해할 수 있었다. D-glucose, D-lactose, D-sucrose, D-maltose, D-cellobiose, D-mannose, D-raffinose을 기질로 하여 산을 생성할 수 있었다.

KCOM 1787과 KCOM 2046 균주들 모두 D-glucose, D-lactose, D-sucrose, D-maltose, D-raffinose 들을 기질로 하여 산을 생성하였으며,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase의 효소들이 존재하였다.

## 5. 세균 지방산 조성, 극성 지방 및 퀴논 분석

세포막을 구성하는 지방산의 구성 성분 및 비율 등을 참고로 미생물을 동정하기 위한 세균 지방산 조성 분석 결과 KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들은 iso-C15:0 성분이 각각 57.9%, 67.2%, 64.9%의 비율로 가장 많이 검출되었다(Table 15).

KCOM 1787과 KCOM 2046 균주들의 지방산 조성 분석 결과, C14:0 DMA 성분이 각각 10.7%, 11.7%의 비율로 가장 많이 검출되었다(Table 16).

Polar lipid 구조를 분석한 결과 KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들은 phosphatidylethanolamine (PE), 3개의 알 수 없는 aminolipids (AL), 5개의 알 수 없는 lipids가 존재하였다. KCOM 2191 균주에서 한 개의 알 수 없는 phospholipid (PL)가 추가로 존재하였다(Fig. 4A-4C).

KCOM 1787과 KCOM 2046 균주들에서 PE, 한 개의 알 수 없는 aminophospholipid (APL)가 존재하였으며, 알 수 없는 AL은 각각 5개, 3개 확인되었고, 알 수 없는 lipids는 각각 3개, 5개가 확인되었다(Fig. 4D와 4E).

Quinone 분석결과 KCOM 2191 균주에서 menaquinone(MK)-6와 한 개의 비동정 MK가 존재하였다(Table 15). KCOM 2668과 KCOM 2812 균주에서 MK-6가 분석되었다(Table 15). 그리고 다른 *Capnocytophaga* spp.의 표준균주들에서도 MK-6가 존재하고 있음을 확인하였다(Table 15).

## 6. 최적 성장 조건 측정

최적 성장 조건을 조사하기 위해 다양한 조건의 온도, pH, NaCl 농도에서 3일 동안 2회 반복하여 배양하고 OD 값을 측정한 결과를 Fig. 5-9 및 Table 17에

정리하였다. KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812의 세 균주들은 30–40℃의 범위 내의 온도에서 성장하였으며 각각 40℃, 35℃ 및 40℃에서 최적의 성장을 보였다. 세 균주 모두 pH 6.0–9.0 범위 내에서 성장하였으며 pH 7.5–8.0에서 최적의 성장을 보였다. KCOM 2191와 KCOM 2668 균주들은 NaCl 0–2% 범위 내의 농도에서, KCOM 2812 균주는 NaCl 0–1.5% 범위 내의 농도에서 성장하였으며 세 균주들 모두 NaCl 0% 농도에서 최적의 성장을 보였다.

KCOM 1787과 KCOM 2046 균주들은 30–40℃의 범위 내의 온도에서 성장하였으며 각각 40℃ 및 35℃에서 최적의 성장을 보였다. KCOM 1787 균주는 pH 5.0–8.5 범위 내에서 성장을 보였으며 pH 6.5에서 최적의 성장을 하였다. KCOM 2046 균주는 pH 6.0–9.0 범위 내에서 성장을 하였으며 pH 7.5에서 최적의 성장을 보여 KCOM 1787 균주와 차이가 있었다. 두 균주 모두 NaCl 0–0.5% 범위 내의 농도에서 성장하였으며 KCOM 1787 균주는 0.5% 농도에서, KCOM 2046 균주는 0–0.5% 농도에서 최적의 성장을 보였다.

Table 3. Summary of sequence analysis of 16S ribosomal RNA genes of three strains of *Capnocytophaga ochracea* isolated from a Korean population

Species	Pairwise Similarity (%)		
	KCOM 2191	KCOM 2668	KCOM 2812
<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 <sup>T</sup>	97.57	98.12	97.14
<i>Capnocytophaga endodontalis</i> ChDC 0S43 <sup>T</sup>	96.65	96.44	96.78
<i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC 33612 <sup>T</sup>	96.18	95.96	96.51
<i>Capnocytophaga leadbetteri</i> AHN8855 <sup>T</sup>	95.66	95.67	95.44
<i>Capnocytophaga haemolytica</i> A0404 <sup>T</sup>	91.38	91.52	91.28
<i>Capnocytophaga stomatis</i> H2177	93.11	93.11	92.95
<i>Capnocytophaga felis</i> KC07070 <sup>T</sup>	92.69	93.04	92.67
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i> DSM 19736 <sup>T</sup>	92.83	92.83	93.02
<i>Capnocytophaga canis</i> CcD38 <sup>T</sup>	91.79	92.08	91.70
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> ATCC 33624 <sup>T</sup>	91.09	90.94	91.05
<i>Capnocytophaga canimorsus</i> 7120 <sup>T</sup>	91.99	92.21	92.11
<i>Capnocytophaga granulosa</i> B0611 <sup>T</sup>	91.35	91.21	91.46

Table 4. Summary of sequence analysis of 16S ribosomal RNA genes of two strains of *Selenomonas sputigena* isolated from a Korean population

Species and strain	Pairwise Similarity (%)	
	KCOM 1787	KCOM 2046
<i>Selenomonas sputigena</i> ATCC 35185 <sup>T</sup>	98.85	99.53
<i>Selenomonas diana</i> ATCC 43527 <sup>T</sup>	91.91	91.77
<i>Gentipeda periodontii</i> DSM 2778 <sup>T</sup>	90.92	90.99
<i>Mitsuokella jalaludinii</i> M9 <sup>T</sup>	90.66	90.93
<i>Selenomonas bovis</i> WG <sup>T</sup>	91.20	91.06
<i>Selenomonas felix</i> Marseille-P3560 <sup>T</sup>	91.51	91.16
<i>Selenomonas massiliensis</i> Marseille-P4036 <sup>T</sup>	91.10	90.82
<i>Selenomonas montiformis</i> WCA-380-WT-3B3 <sup>T</sup>	91.77	91.57
<i>Selenomonas noxia</i> ATCC 43541 <sup>T</sup>	90.58	90.65

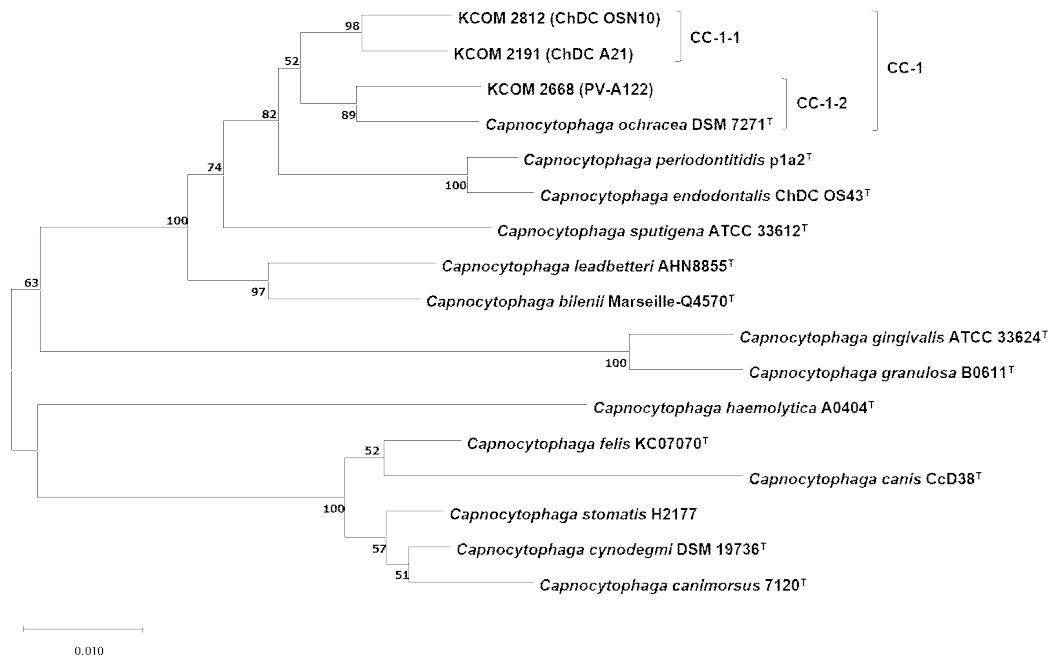


Fig. 1. Phylogenetic trees based on partial nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA genes of type strains of genus *Capnocytophaga*. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses (1,000 replicates, represent the value as % in the front of each cluster) with the neighbor-joining method of MEGA X software (Kumar *et al.*, 2018).

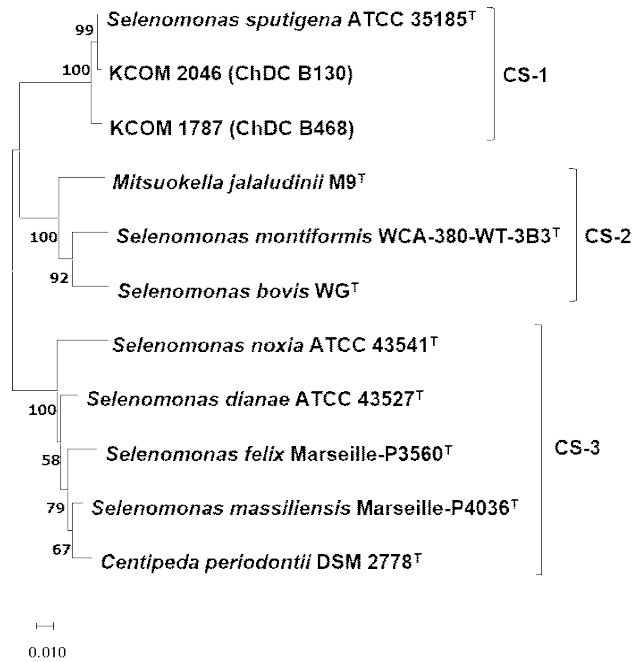


Fig. 2. Phylogenetic trees based on the partial nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA genes of type strains of *Selenomonas* spp. and closely related genus. The resulting tree topology was evaluated by bootstrap analyses (1,000 replicates, represent the value as % in the front of each cluster) with the neighbor-joining method of MEGA X software (Kumar *et al.*, 2018).



Table 5. Summary of whole genome sequences of five strains used in this study

	Strain				
	KCOM 2191	KCOM 2668	KCOM 2812	KCOM 1787	KCOM 2046
Sequencing technologies	PacBio RSII / Illumina HiSeq	PacBio RSII	PacBio RSII / Illumina HiSeq	Illumina HiSeq	PacBio RSII
Total reads <sup>a</sup>	12,842,808	156,174	11,104,851	28,578,694	174,777
Total read bases	2,777,297,498	1,435,172,364	2,478,397,482	2,830,128,524	1,015,359,276
Total length (base)	2,672,569	2,779,391	2,807,434	2,613,980	2,740,586
Coverage <sup>b</sup> (X)	1,039	516	883	1,083	370
N50 <sup>c</sup> (base)	11,291	12,593	12,576	–	8,688
Contig No.	1	1	1	1	1
Chromosome No.	1	1	1	1	1
DNA G+C content (mol%)	39.7	39.3	39.3	56.9	57.2
Gene	2,318	2,424	2,476	2,488	2,535
CDS	2,230	2,342	2,383	2,380	2,439
tRNA	47	47	47	53	53
rRNA	12	12	12	12	12

a, The total number of reads that passed filtering.

b, The number of unique reads that include a given nucleotide in the reconstructed sequence.

c, 50% of all bases come from subreads longer than this value.

Table 6. Summary of average nucleotide identity (ANI) analysis for three strains of *Capnocytophaga ochracea* isolated from a Korean population

Species and strain	ANI value (%)		
	KCOM 2191	KCOM 2668	KCOM 2812
KCOM 2191	100	96.50	96.63
KCOM 2668	96.50	100	96.63
KCOM 2812	96.63	96.63	100
<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271 <sup>T</sup>	96.43	96.33	96.33
<i>Capnocytophaga endodontalis</i> ChDC 0S43 <sup>T</sup>	84.65	84.80	85.15
<i>Capnocytophaga periodontitidis</i> p1a2 <sup>T</sup>	84.44	84.42	84.66
<i>Capnocytophaga sputigena</i> ATCC 33612 <sup>T</sup>	83.42	83.49	83.67
<i>Capnocytophaga leadbetteri</i> AHN8855 <sup>T</sup>	77.17	77.20	77.59
<i>Capnocytophaga haemolytica</i> A0404 <sup>T</sup>	72.38	72.04	72.15
<i>Capnocytophaga stomatis</i> H2177	70.64	70.63	70.83
<i>Capnocytophaga felis</i> KC07070 <sup>T</sup>	70.58	70.51	70.55
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i> DSM 19736 <sup>T</sup>	70.45	70.46	70.68
<i>Capnocytophaga canis</i> CcD38 <sup>T</sup>	70.42	70.50	70.43
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> ATCC 33624 <sup>T</sup>	70.37	70.44	70.09
<i>Capnocytophaga canimorsus</i> 7120 <sup>T</sup>	70.17	70.04	70.20
<i>Capnocytophaga granulosa</i> B0611 <sup>T</sup>	69.85	70.04	70.64

Table 7. Summary of average nucleotide identity (ANI) analysis for two strains of *Selenomonas sputigena* isolated from a Korean population

Species and strain	ANI value (%)	
	KCOM 1787	KCOM 2046
KCOM 1787	100	95.19
KCOM 2046	95.19	100
<i>Selenomonas sputigena</i> ATCC 35185 <sup>T</sup>	95.34	95.69
<i>Centipeda periodontii</i> DSM 2778 <sup>T</sup>	71.60	71.30
<i>Mitsuokella jalaludinii</i> M9 <sup>T</sup>	72.52	72.89
<i>Selenomonas bovis</i> WG <sup>T</sup>	72.15	72.11
<i>Selenomonas felix</i> Marseille-P3560 <sup>T</sup>	71.20	70.84
<i>Selenomonas massiliensis</i> Marseille-P4036 <sup>T</sup>	71.42	71.38
<i>Selenomonas montiformis</i> WCA-380-WT-3B3 <sup>T</sup>	68.92	69.01
<i>Selenomonas noxia</i> ATCC 43541 <sup>T</sup>	70.06	69.86

Table 8. Summary of genome-to-genome distance (GGD) analysis for three strains of *Capnocytophaga ochracea* isolated from a Korean population

Species and strain	Predicting DDH value by GGD calculation [confidence-interval] (%); quarry genome		
	KCOM 2191	KCOM 2668	KCOM 2812
KCOM 2191	100 [100-100%]	67.9 [64.9-70.7%]	70.5 [67.5-73.3%]
KCOM 2668	67.9 [64.9-70.7%]	100 [100-100%]	69.1 [66.1-72.0%]
KCOM 2812	70.5 [67.5-73.3%]	69.1 [66.1-72.0%]	100 [100-100%]
<i>C. ochracea</i> DSM 7271 <sup>T</sup>	67.9 [64.9-70.7%]	66.0 [63.0-68.8%]	66.6 [63.6-69.4%]
<i>C. endodontalis</i> ChDC OS43 <sup>T</sup>	33.1 [30.7-35.6%]	33.2 [30.8-35.8%]	34.6 [32.2-37.1%]
<i>C. periodontitidis</i> p1a2 <sup>T</sup>	33.1 [30.6-35.6%]	32.9 [30.4-35.4%]	33.9 [31.5-36.4%]
<i>C. sputigena</i> ATCC 33612 <sup>T</sup>	30.7 [28.3-33.2%]	30.8 [28.4-33.3%]	31.0 [28.6-33.5%]
<i>C. leadbetteri</i> AHN8855 <sup>T</sup>	23.6 [21.3-26.1%]	23.8 [21.5-26.3%]	25.3 [23.0-27.8%]
<i>C. haemolytica</i> A0404 <sup>T</sup>	28.9 [26.5-31.4%]	26.5 [24.2-29.0%]	26.5 [24.2-29.0%]
<i>C. stomatis</i> H2177	23.9 [21.5-26.3%]	25.2 [22.9-27.7%]	22.5 [20.2-24.9%]
<i>C. felis</i> KC07070 <sup>T</sup>	23.0 [20.7-25.5%]	24.8 [22.5-27.3%]	24.1 [21.8-26.5%]
<i>C. cynodegmi</i> DSM 19736 <sup>T</sup>	22.1 [19.8-24.5%]	23.1 [20.8-25.6%]	22.1 [19.8-24.5%]
<i>C. canis</i> CcD38 <sup>T</sup>	24.4 [22.1-26.9%]	23.9 [21.6-26.4%]	23.3 [21.0-25.8%]
<i>C. gingivalis</i> ATCC 33624 <sup>T</sup>	30.7 [28.3-33.2%]	29.3 [26.9-31.8%]	28.7 [26.3-31.2%]
<i>C. canimorsus</i> 7120 <sup>T</sup>	23.8 [21.5-26.3%]	23.7 [21.4-26.1%]	23.5 [21.2-26.0%]
<i>C. granulosa</i> B0611 <sup>T</sup>	25.1 [22.8-27.6%]	25.0 [22.7-27.5%]	32.1 [29.7-34.6%]

Table 9. Genome-to-genome distance (GGD) values for the strain of this study and each type strain of *Selenomonas* spp./others genus

Species and strain	Predicting DDH value by GGD calculation [confidence-interval] (%); quarry genome	
	KCOM 1787	KCOM 2046
KCOM 1787	100 [100-100%]	60.5 [57.6-63.3%]
KCOM 2046	60.5 [57.6-63.3%]	100 [100-100%]
<i>S. sputigena</i> ATCC 35185 <sup>T</sup>	61.6 [58.7-64.4%]	63.7 [60.8-66.6%]
<i>C. periodontii</i> DSM 2778 <sup>T</sup>	21.9 [19.6-24.3%]	21.6 [19.4-24.1%]
<i>M. jalaludini</i> M9 <sup>T</sup>	18.9 [16.8-21.3%]	18.9 [16.7-21.2%]
<i>S. bovis</i> WG <sup>T</sup>	19.2 [17.0-21.6%]	19 [16.8-21.4%]
<i>S. felix</i> Marseille-P3560 <sup>T</sup>	21.1 [18.9-23.5%]	19.7 [17.5-22.1%]
<i>S. massiliensis</i> Marseille-P4036 <sup>T</sup>	23.4 [21.1-25.8%]	23 [20.7-25.4%]
<i>S. montiformis</i> WCA-380-WT-3B3 <sup>T</sup>	19.6 [17.5-22.0%]	20.2 [18.0-22.6%]
<i>S. noxia</i> ATCC 43541 <sup>T</sup>	19.5 [17.3-21.9%]	19.9 [17.7-22.3%]

Table 10. Summary of cell morphology observation

Strains	Colony diameter (mm)	Cell length ( $\mu\text{m}$ )	Cell diameter ( $\mu\text{m}$ )
<i>Capnocytophaga ochracea</i> KCOM 2191	$0.4 \pm 0.1$	$3.2 \pm 1.0$	$0.25 \pm 0.01$
<i>Capnocytophaga ochracea</i> KCOM 2668	$0.3 \pm 0.1$	$3.7 \pm 3.0$	$0.28 \pm 0.03$
<i>Capnocytophaga ochracea</i> KCOM 2812	$0.5 \pm 0.1$	$2.7 \pm 0.9$	$0.25 \pm 0.02$
<i>Selenomonas sputigena</i> KCOM 1787	$0.7 \pm 0.2$	$1.7 \pm 0.2$ flagella: $5.8 \pm 0.7$	$0.48 \pm 0.03$
<i>Selenomonas sputigena</i> KCOM 2046	$0.8 \pm 0.3$	$2.1 \pm 0.3$ flagella: $5.8 \pm 0.8$	$0.61 \pm 0.04$

Table 11. Results of biochemical tests of five strains used in this study using API 20A kit

Reactions / Enzymes	Strain				
	KCOM 2191	KCOM 2668	KCOM 2812	KCOM 1787	KCOM 2046
Acid production from					
L-arabinose	-	-	-	-	-
D-cellobiose	+	+	+	-	-
D-glucose	+	+	+	+	+
glycerol	-	-	-	-	-
D-lactose	+	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-	-
D-mannose	+	+	+	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-
D-raffinose	+	+	+	+	+
D-rhamnose	-	-	-	-	-
D-sucrose	+	+	+	+	+
salicin	-	-	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	-	-
D-trehalose	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-	-	-
Indol formation	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-

Table 12. Results of biochemical tests of five strains used in this study using RAPID ID 32 A kit

Reactions / Enzymes	Strain				
	KCOM 2191	KCOM 2668	KCOM 2812	KCOM 1787	KCOM 2046
Urease	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Galactosidase	-	-	-	+	+
$\beta$ -Galactosidase	-	-	-	+	+
$\beta$ -Galactosidase 6-phosphate	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Glucosidase	-	-	-	-	-
$\beta$ -Glucosidase	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Arabinosidase	-	-	-	-	-
$\beta$ -Glucuronidase	-	-	-	-	-
N-acetyl-b-glucosaminidase	-	-	-	-	-
Mannose fermentation	+	+	+	-	-
Raffinose fermentaion	+	+	+	-	-
Reduction of nitrates	-	-	-	+	-
Indole production	-	-	-	-	-
Alkaline phosphatase	+	+	+	-	-
Arginine arylamidase	+	+	+	-	-
Proline arylamidase	+	+	+	-	-
Leucyl glycine arylamidase	+	+	+	-	-
Phenylalanine arylamidase	+	+	+	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	-	-
Pyroglutamic acid arylamidase	-	-	-	-	-
Tyrosine arylamidase	+	+	+	-	-
Alanine arylamidase	+	+	+	-	-
Glycine arylamidase	+	+	+	-	-
Glutamic acid decarboxylase	-	-	-	-	-
$\alpha$ -fucosidase	-	-	-	-	-
Histidine arylamidase	+	+	+	-	-
Glutamyl glutamic acid arylamidase	+	+	+	-	-
Serine arylamidase	+	+	+	-	-



Table 13. Summary of biochemical characteristics of three strains of *Capnocytophaga ochracea* used in this study and type strains of *Capnocytophaga* spp.

Characteristic	Species and strain								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acid production from:									
D-Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	-	-
DNA G+C content (mol%)	39.7	39.3	39.3	39.6	38.2	38.4	44.0	40.5	41.7
Reference	a	a	a	b, f	d	f	c	e, f	c

Strains: 1, KCOM 2191; 2, KCOM 2668; 3, KCOM 2812; 4, *C. ochracea* ATCC 27872<sup>T</sup>; 5, *C. endodontalis* ChDC 0S43<sup>T</sup>; 6, *C. sputigena* ATCC 33612<sup>T</sup>; 7, *C. haemolytica* ATCC 51501<sup>T</sup>; 8, *C. gingivalis* ATCC 33624<sup>T</sup>; 9, *C. granulosa* ATCC 51502<sup>T</sup>.

Reference: a, in this study; b, Frandsen *et al.*, 2008; c, Yamamoto *et al.*, 1994; d, Jo *et al.*, 2018; e, London *et al.*, 1985; f, Leadbetter *et al.*, 1979.

Table 14. Summary of biochemical characteristics of two strains of *Selenomonas sputigena* used in this study and type strains of *Selenomonas* spp.

Characteristic	Species and strain											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Acid production from:												
L-Arabinose	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	NT	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
D-Melezitose	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-
D-Rhamnose	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
D-Trehalose	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
D-Maltose	+	+	+	+	+	NT	+	-	+	+	+	+
D-Mannose	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
D-Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	-	+	+	+	-	NT	-	+	+	+	+
Esculin hydrolysis	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
DNA G+C content (mol%)	56.9	57.2	57.1	53.0	56.8	63.9	56.8	57.0	53.0	56.0	58.0	58.0
Reference	a	a	e	f	d	b	c	e	e	e	e	e

Strains: 1, KCOM 1787; 2, KCOM 2046; 3, *S. sputigena* ATCC 35185<sup>T</sup>; 4, *C. periodontii* ATCC 35019<sup>T</sup>; 5, *M. jalaludinii* M9<sup>T</sup>; 6, *S. bovis* WG<sup>T</sup>; 7, *S. felix* Marseille-P3560<sup>T</sup>; 8, *S. noxia* ATCC 43541<sup>T</sup>; 9, *S. diana* ATCC 43527<sup>T</sup>; 10, *S. flueggei* ATCC 43531<sup>T</sup>; 11, *S. infelix* ATCC 43532<sup>T</sup>; 12, *S. artemidis* ATCC 43528<sup>T</sup>. NT, Not tested.

Reference: a, in this study; b, Zhang and Dong, 2009; c, Kuete *et al.*, 2019; d, Lan *et al.*, 2002; e, Moore *et al.*, 1987; f, Lai *et al.*, 1983.

Table 15. Chemotaxonomic characteristics of three strains of *Capnocytophaga ochracea* used in this study and type strains of *Capnocytophaga* spp.

CFA composition (%)*	Species and strain								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
iso-C13:0	0.9	1.2	0.5	tr	0.8	1.5	tr	3.5	1.5
C14:0	1.2	0.7	0.8	1.1	1.4	1.1	tr	tr	1.1
iso-C15:0	57.9	67.2	64.9	51.5	57.5	55.3	69.1	68.4	72.8
anteiso-C15:0	2.8	1.0	2.9		1.5				
C15:0	1.0	0.5	2.1	1.9	1.1	tr	tr	1.2	tr
C16:0	8.5	5.6	9.8	12.6	5.9	4.7	4.9	4.1	5.6
iso-C15:0 30H	2.0	3.2	1.7		2.7				
C16:0 30H	4.8	3.2	3.0	10.0	5.7	4.4	4.9	4.4	5.4
C18:2 cis-9,12	1.5	1.0	1.4		1.4				
C18:1 cis-9	5.1	5.0	4.6		4.4				
C18:0	2.2	1.9	2.3	12.4	1.4	25.8	15.3	14.4	10.0
Summed Feature 3		2.8	0.8		0.2				
Sum In Feature 11	10.9	5.0	3.0		14.1				
Isoprenoid quinone	MK-6, UNO	MK-6	MK-6	MK-6	MK-6	MK-6	MK-6	MK-6	MK-6
Reference	a	a	a	b	c	b	b	b	b

Strains: 1, KCOM 2191; 2, KCOM 2668; 3, KCOM 2812; 4, *C. ochracea* ATCC 27872<sup>T</sup>; 5, *C. endodontalis* ChDC 0S43<sup>T</sup>; 6, *C. sputigena* ATCC 33612<sup>T</sup>; 7, *C. haemolytica* ATCC 51501<sup>T</sup>; 8, *C. gingivalis* ATCC 33624<sup>T</sup>; 9, *C. granulosa* ATCC 51502<sup>T</sup>. tr, trace (less than 1%); Summed Feature 3, iso-C15:0 ALDE/UN 13.570; Sum In Feature 11, iso-C17:0 30H/C18:2 DMA. Reference: a, in this study; b, Yamamoto *et al.*, 1994; c, Jo *et al.*, 2018.

\*, If the fatty acid content was less than 1% in all strains, it was omitted. UNO, unknown one.

Table 16. Comparison of cellular fatty acid (CFA) contents of two strains of *Selenomonas sputigena* used in this study and type strains of *Selenomonas* spp.

CFA composition (%)*	Species and strain								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C10:0	0.3	1.2	0.8	0.5		0.6	0.7		0.6
C11:0	3.4	2.7	10.9	3.6	6.2	6.6	5.9	4.9	5.1
C12:0	3.2	2.1	3.0	5.1	1.6	2.5	1.7		2.2
C13:0	2.8	2.8	7.0	9.1	13.4	14.8	14	17.9	16.7
UN 13.493	0.7	0.8	0.8	1.2	1.4	1.1	1.9		0.5
C14:0	2.4	2.0	1.4	6.4	1.6	1.3	1.0		1.4
C14:0 DMA	10.7	11.7	35.6	11.8	17.0	19.7	20.2	16.8	20.3
C15:1 cis-9/t 8	0.9	1.3	0.2						
C15:0	7.9	6.3	11.1	6.7	12.0	10.2	12.5	15.4	13.2
Sum In Feature 5	4.5	5.2							
C16:1 cis-7	9.3	8.3	3.3	5.6	6.5	5.0	5.0	3.7	4.1
C16:1 cis-9	2.1	2.7							
C16:0	2.0	2.1	0.7	2.4	0.6			7.9	
C16:0 DMA	0.5	0.6	1.0	3.0		2.3			2.4
C17:0	1.3	1.2	2.5	1.3	0.8	0.7	1.3	5.2	0.7
UN 17.223	2.5	2.3		2.2	4.8	2.1	2.4		3.2
C18:1 AT 17.254 DMA	9.3	9.8	3.4	5.1	9.6	3.6	3.7	8.6	5.3
C17:0 DMA	0.9	0.8	1.3	1.6	3.5	0.8	0.7	4.8	2.9
C18:1 cis-9	3.2	3.6	0.8	4.8	1.2	0.8	0.9		0.5
C18:0	1.1	1.2		1.4	0.5			5.5	
C18:1 cis-9 DMA	2.9	3.2	0.6	3.9	1.7	0.9			1.1
C19:0 cyc-9,10 DMA	2.5	-							
Summed Feature 2	1.2	1.2							
Summed Feature 4	9.9	9.9							
Summed Feature 5	4.5	5.2							
Summed Feature 6	2.4	1.7							
Summed Feature 7	2.0	2.1							
Summed Feature 8	8.7	10.3							
Reference	a	a	b	b	b	b	b	b	b

Strains: 1, KCOM 1787; 2, KCOM 2046; 3, *S. sputigena* ATCC 35185<sup>T</sup>; 4, *S. noxia* ATCC 43541<sup>T</sup>; 5, *S. flueggei* ATCC 43531<sup>T</sup>; 6, *S. infelix* ATCC 43532<sup>T</sup>; 7, *S. diana* ATCC 43527<sup>T</sup>; 8, *S. artemidis* ATCC 43528<sup>T</sup>; 9, *C. periodontii* ATCC 35019<sup>T</sup>. Summed Feature 2, C12:0 3OH/C13:0 DMA; Summed Feature 4, C15:2/UN 14.762 C15:2; Summed Feature 5, C15:0 DMA/C14:0 3OH; Summed Feature 6, anteiso-C15:0 3OH/C16:1 cis-7 DMA; Summed Feature 7, C17:2/C17:1 cis-8; Summed Feature 8, C17:1 cis-9/C17:2. Reference: a, in this study; b, Moore *et al.*, 1987.

\*, If the fatty acid content was less than 1% in all strains, it was omitted.

Table 17. Summary of optimal growth conditions for strains used in this study

Species and strains	Range of optimal growth condition		
	Temperature, °C	pH	NaCl, %
	(best)	(best)	(best)
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	30–40	6.0–9.0	0.0–2.0
KCOM 2191	(40)	(7.5–8.0)	(0.0)
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	30–40	6.0–9.0	0.0–2.0
KCOM 2668	(35)	(7.5–8.0)	(0.0)
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	30–40	6.0–9.0	0.0–1.5
KCOM 2812	(40)	(7.5–8.0)	(0.0)
<i>Selenomonas sputigena</i>	30–40	5.0–8.5	0.0–0.5
KCOM 1787	(40)	(6.5)	(0.5)
<i>Selenomonas sputigena</i>	30–40	6.0–9.0	0.0–0.5
KCOM 2046	(35)	(7.5)	(0.0–0.5)

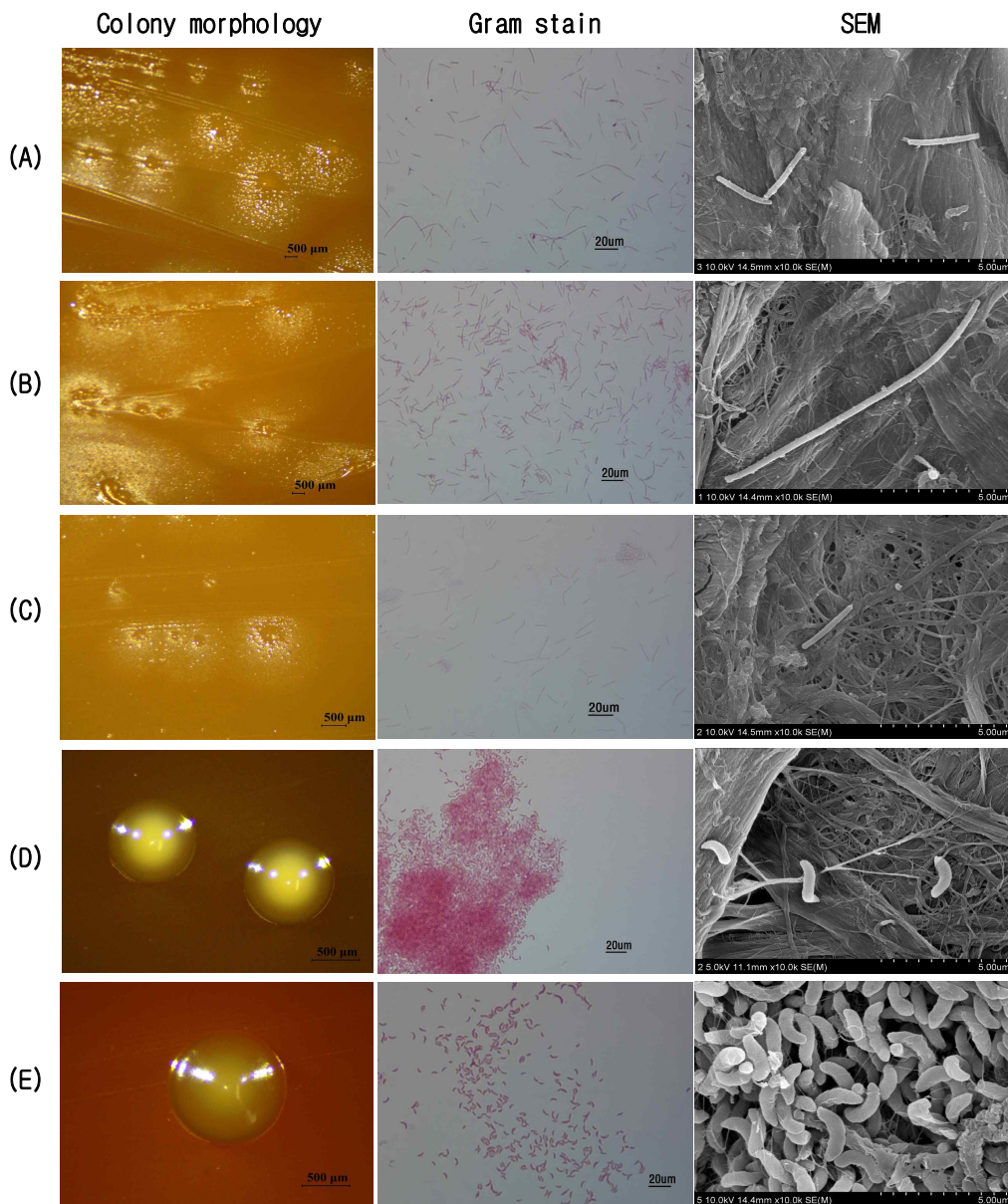


Fig. 3. Cell morphology observation. (A), *Capnocytophaga ochracea* KCOM 2191; (B), *Capnocytophaga ochracea* KCOM 2668; (C), *Capnocytophaga ochracea* KCOM 2812; (D), *Selenomonas sputigena* KCOM 1787; (E), *Selenomonas sputigena* KCOM 2046. SEM, scanning electron microscopy.

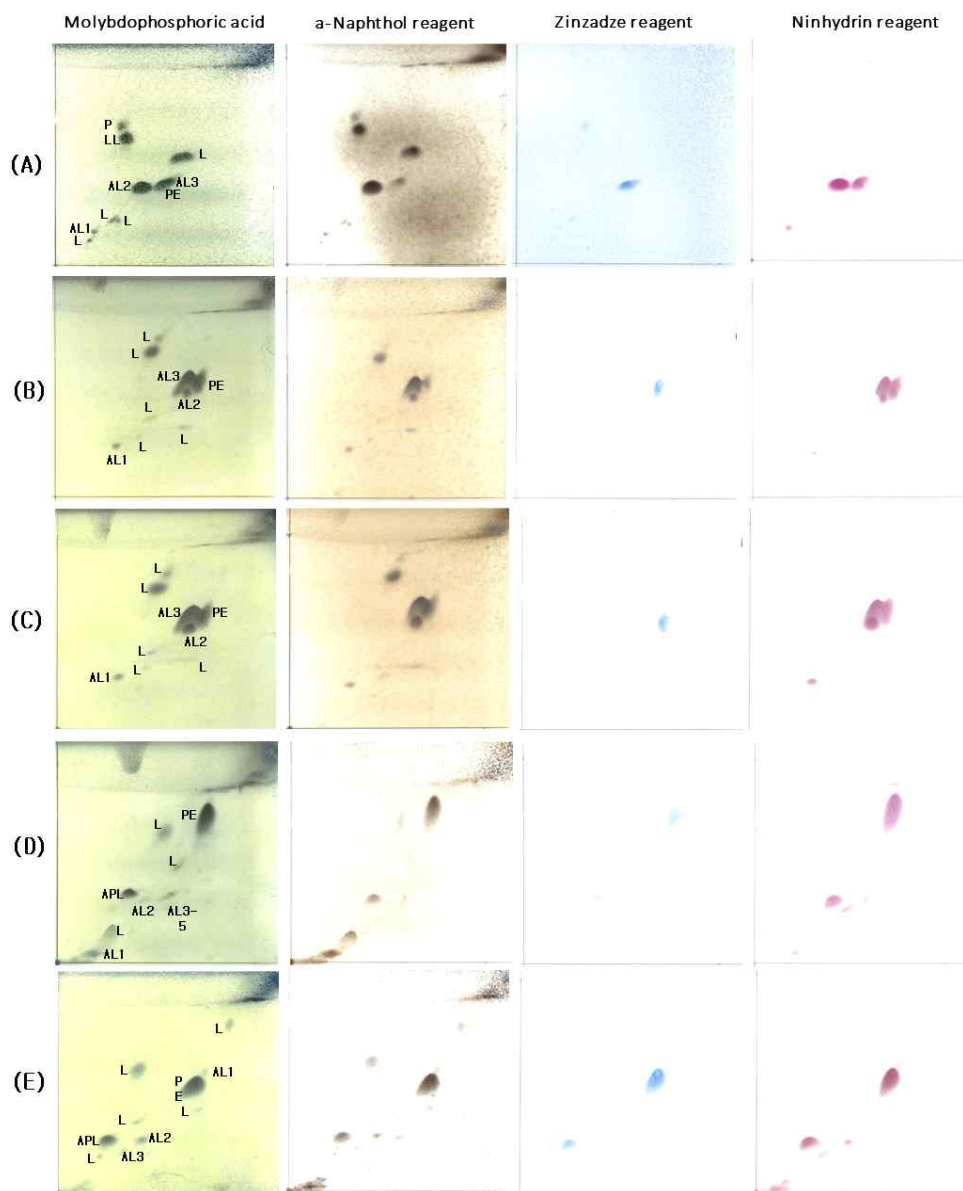


Fig. 4. Two-dimensional thin-layer chromatography for analysis of polar lipids in study strains. (A), *Capnocytophaga ochracea* KCOM 2191; (B), *Capnocytophaga ochracea* KCOM 2668; (C), *Capnocytophaga ochracea* KCOM 2812; (D), *Selenomonas sputigena* KCOM 1787; (E), *Selenomonas sputigena* KCOM 2046. AL, aminolipid; APL, aminophospholipid; PE, phosphatidylethanolamine; PL, phospholipid; L, lipid.

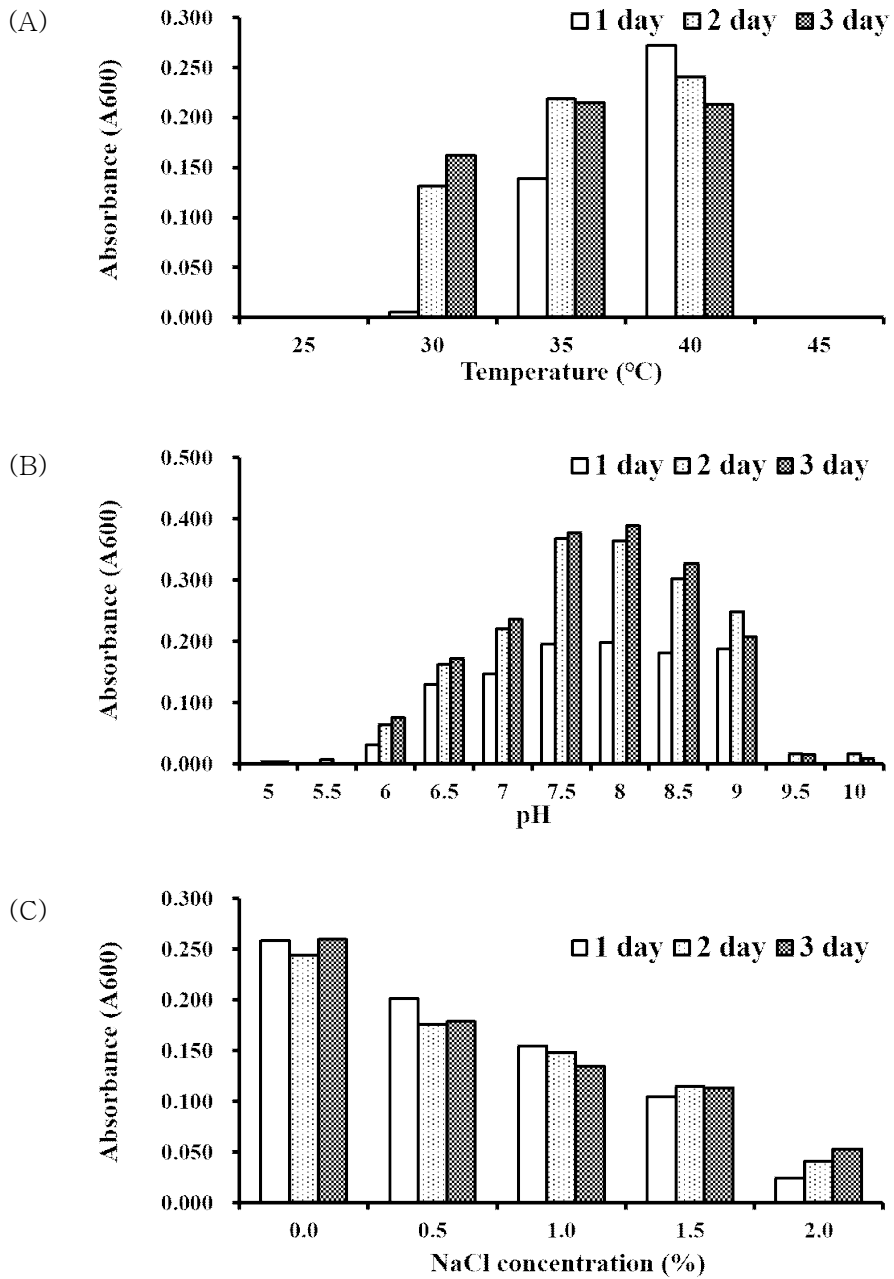


Fig. 5. Optimal growth conditions for *Capnocytophaga ochracea* KCOM 2191. (A) temperature, (B) pH, and (C) NaCl concentration.



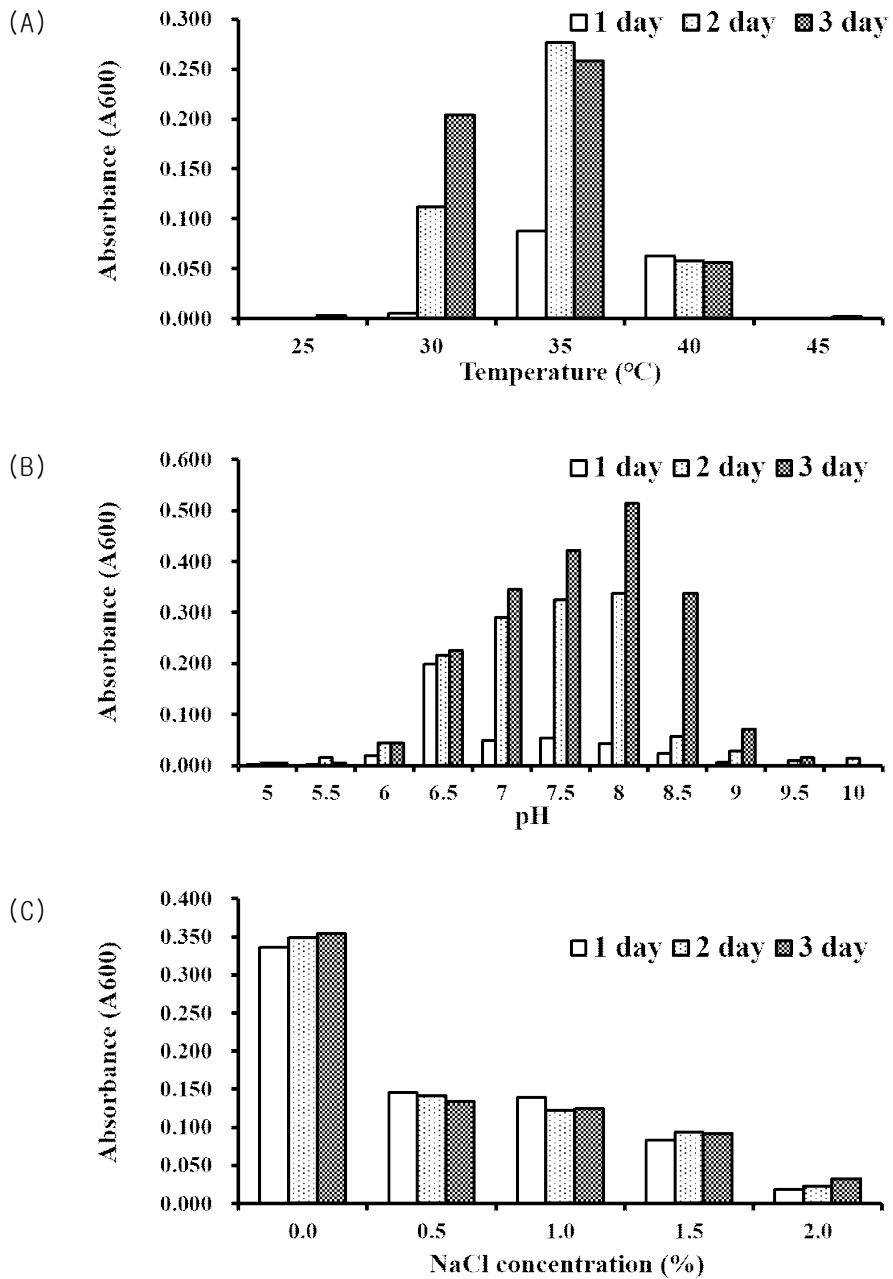


Fig. 6. Optimal growth conditions for *Capnocytophaga ochracea* KCOM 2668. (A) temperature, (B) pH, and (C) NaCl concentration.

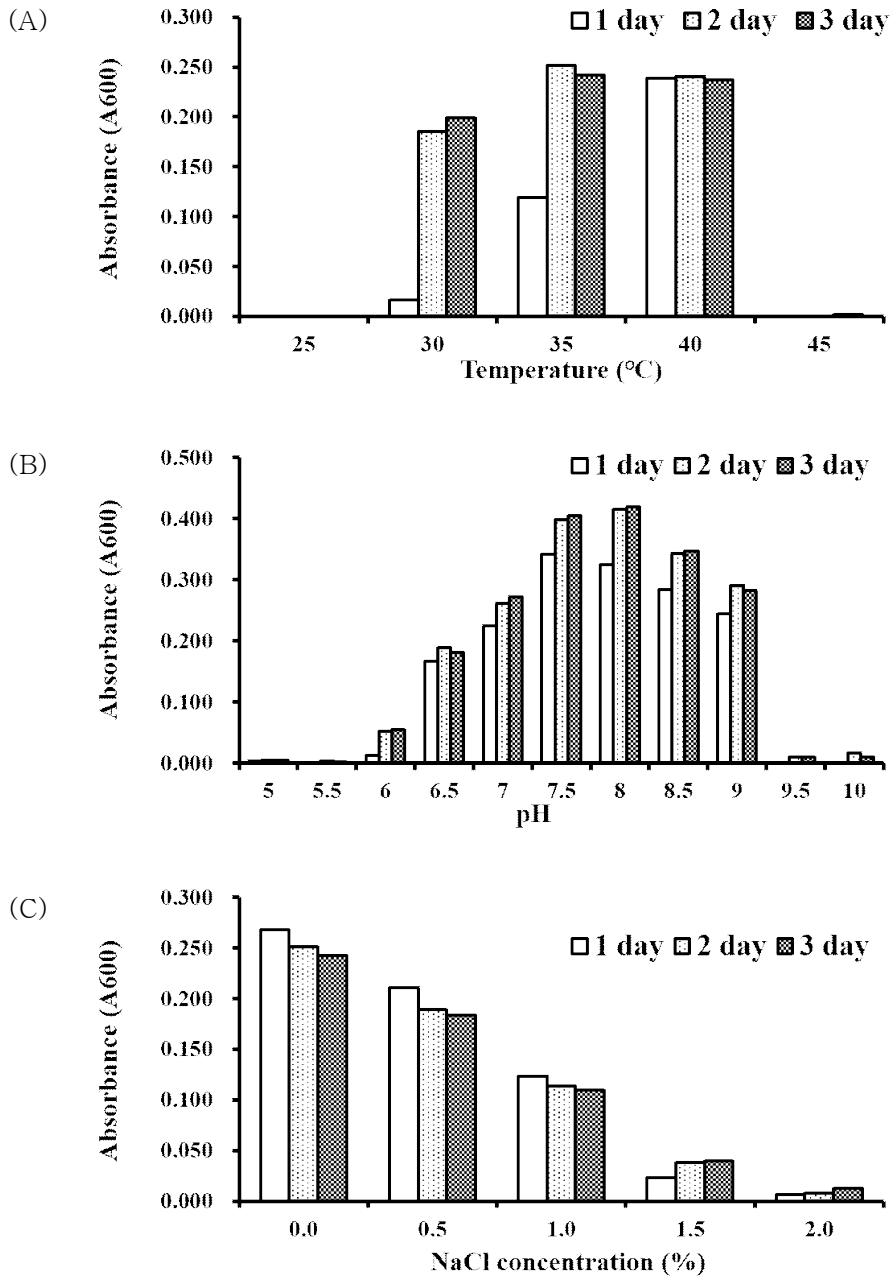


Fig. 7. Optimal growth conditions for *Capnocytophaga ochracea* KCOM 2812. (A) temperature, (B) pH, and (C) NaCl concentration.

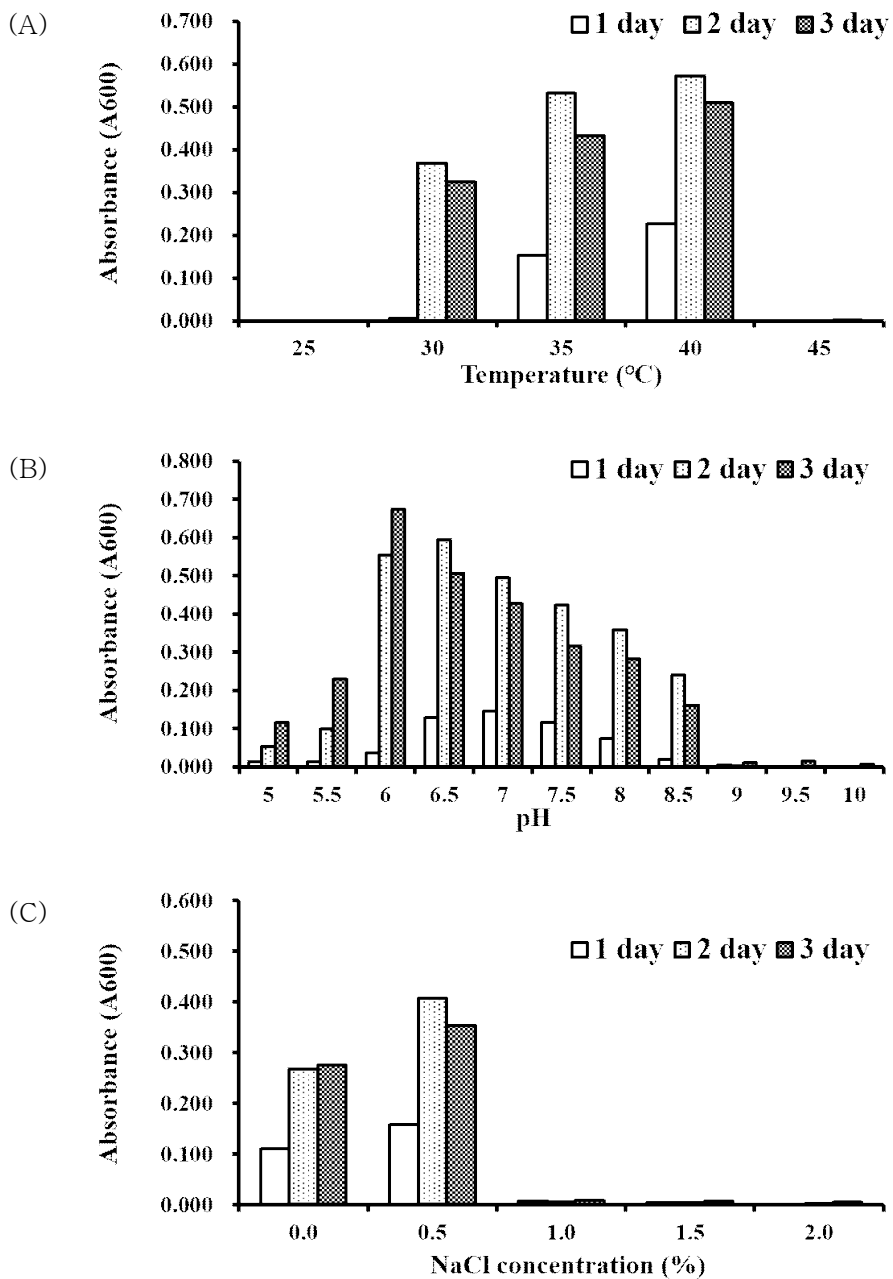


Fig. 8. Optimal growth conditions for *Selenomonas sputigena* KCOM 1787. (A) temperature, (B) pH, and (C) NaCl concentration.

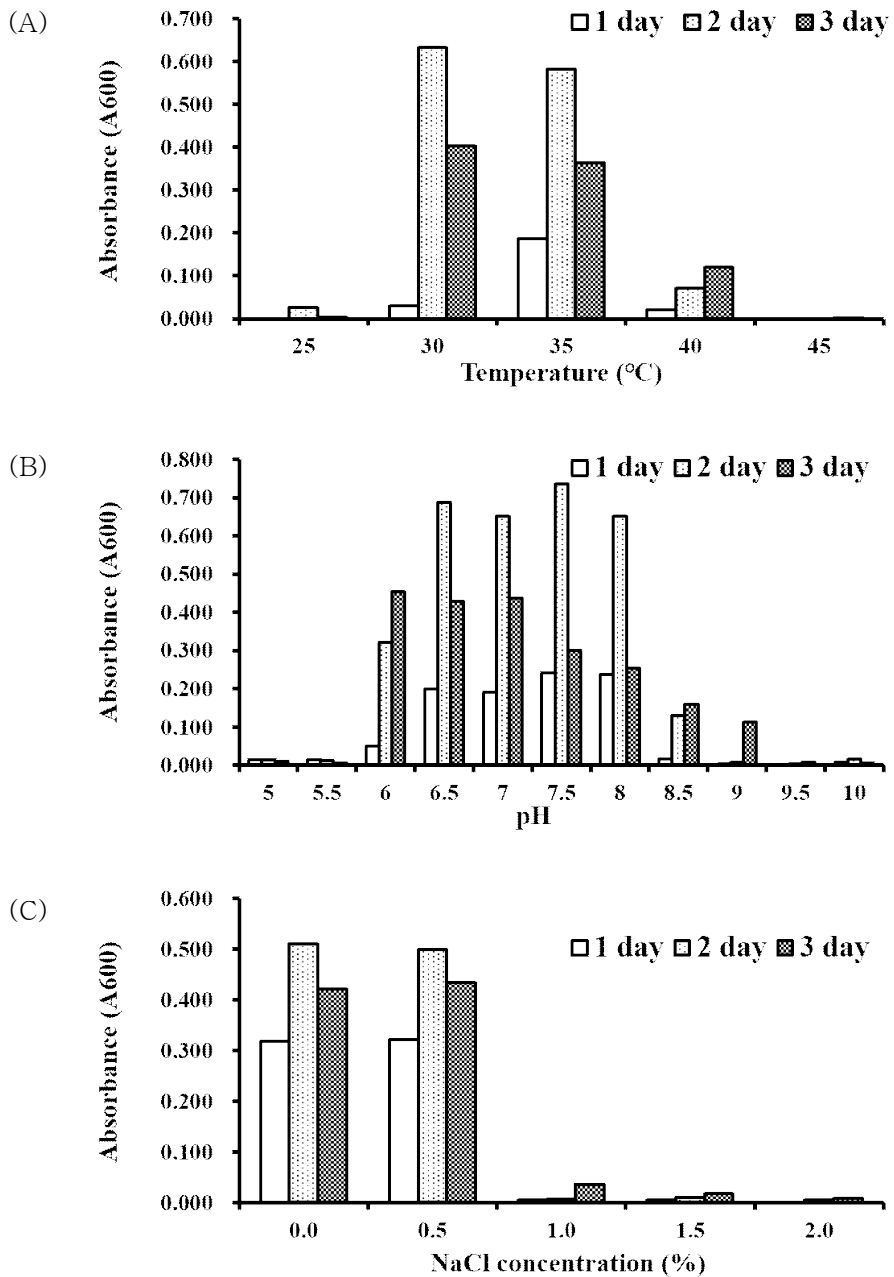


Fig. 9. Optimal growth conditions for *Selenomonas sputigena* KCOM 2046. (A) temperature, (B) pH, and (C) NaCl concentration.

## IV. 총괄 및 고안

본 연구는 16S rDNA 염기서열 비교분석법만을 이용하여 *C. ochracea*로 동정된 3개 균주와 *S. sputigena*로 동정된 2개 균주의 전장 유전체 염기서열을 결정하여 종-수준으로 최종 동정하고 이들의 형태학적 특성, 생화학적 특성, 지방산 조성 분석, 극성 지방 분석, 퀴논 분석 및 최적 성장 조건 측정을 통하여 특성을 밝혀, 향후 병인론 연구에 이용하고자 시행되었다.

본 연구 결과 KCOM 2191, KCOM 2668, KCOM 2812 균주들의 세균 전장 유전체 염기서열의 ANI 분석법에서 *C. ochracea* 표준균주와 ANI 값이 96.33–96.43%의 상동성을 보였다. 반면에, GGD 분석에 의한 결과에 의하면, 이들 세 균주는 *C. ochracea* 표준균주와 GGD 값이 66.0–67.9%로 같은 종의 기준이 되는 70% 이하의 상동성을 보였다. 또한, 이들 세 균주들의 16S rDNA 염기서열 상동성은 *C. ochracea* 표준균주와 97.14–98.12%를 보여, Stackebrandt와 Ebers (2006)에 의해 제시된 98.7% 이하의 상동성을 보였다. 하지만, Stackebrandt와 Goebel (1994)이 제시한 97.0%보다는 높은 상동성을 보였다. 세균의 종-수준의 동정에 있어서, 최근 전장 유전체를 이용하여 세균을 분류할 때, 동정을 요하는 균주(표적 균주)와 기존에 알려진 특정 종의 표준균주의 16S rDNA 상동성이 98.7% 이상일 경우, 표적 균주를 해당 표준균주와 같은 종으로 동정하고, 16S rDNA 상동성이 98.7% 이하일 경우, 전장 유전체 염기서열을 반드시 밝혀서 ANI 혹은 GGD 분석법을 시행하여 최종 종-수준으로 동정하는 것이 제안되었다(Chun *et al.*, 2018). Kim 등(2014)에 의해, ANI 분석법 중 하나인 OrthoANI 분석 알고리즘을 개발하는 과정에서 기존에 GenBank 데이터베이스에 16S rDNA와 전장유전체 염기서열이 모두 저장되어 있는 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 균주 간의 ANI 값은 97.43–99.09%로 높은 편이었지만, 16S rDNA 상동성 값은 98.00–98.20%로 낮았다는 것이 보고되었다. 그리고, 최근 *Fusobacterium nucleatum*의 4개 아종을 새로운 4개 종으로 재분류한 연구에서도, *F. animalis* 종에 속하는 균주들과 *F. animalis* ATCC 51191<sup>T</sup> 표준균주의 ANI 값은 96% 이상이었지만, GGD 값이 70% 미만인 것도 있었다(Kook *et al.*, 2017). 이러한 연구결과들을 종합할 때, 비록 KCOM 2191, KCOM 2668, KCOM 2812 균주들의 GGD

값이 *C. ochracea* 표준균주와 같은 종의 기준이 되는 70%보다는 낮은 값을 보였지만, 16S rDNA 상동성 값이 97% 이상이었고, ANI 값이 95% 이상이었다는 점을 고려하면, 이들 균주들은 *C. ochracea*로 분류된다고 판단된다.

본 연구 결과, KCOM 1787 및 KCOM 2046 균주들은 *S. sputigena* 표준균주와 같은 종의 기준이 되는 16S rDNA 상동성이 98.7% 이상을 보였으며, ANI 값은 95% 이상의 상동성을 보였지만, GGD 값은 70% 이하(각각 61.6%와 63.7%)를 보였다. 이러한 결과는 앞에서 언급한 것과 같이, 이들 두 균주들은 종-수준의 분류 기준을 16S rDNA 상동성 97% 이상과 ANI 값 95%를 적용하여, *S. sputigena*로 판정되는 것으로 판단된다. 하지만, 본 연구에서 5개 균주들의 종 수준으로의 동정에 있어서, 전장 유전체 염기서열 상동성 비교분석법인 ANI 분석과 GGDC 분석에 의한 결과가 상이한 경우가 있다는 것은, 아직도 세균의 종-수준에서의 분류법에 있어서 문제점이 있다는 것을 시사한다. 특히, 종-수준으로의 기준이 되는 ANI 혹은 GGD 값은 기존의 16S rDNA 염기서열 상동성 비교분석법과 물리적인 방법으로 측정된 전장 유전체 상동성법인 DNA-DNA hybridization법의 결과를 기준으로 설정된 것이 그 원인들 중 하나라고 판단된다. 그러므로, 향후 종-수준에서의 동정에 있어서 새로운 기준법 확립이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구 결과 전장 유전체 염기서열 상동성 비교분석법으로 *C. ochracea*로 동정된 KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들의 G+C 함량은 *C. orachea* 표준균주의 G+C 함량과 1 mol% 미만의 차이가 있는 것으로 조사되었다(Talbe 16). 또한, *S. sputigena*로 동정된 KCOM 1787 및 KCOM 2046 균주들의 G+C 함량도 *S. sputigena* 표준균주의 G+C 함량과 1 mol% 미만의 차이가 있는 것으로 조사되었다(Talbe 17). 차세대 핵산 염기서열 결정법이 개발되기 전, 열변성(thermal denaturation), CsCl을 이용한 부력 밀도(buoyant density), melting profile 및 high performance liquid chromatography 등을 이용하여 간접적으로 세균 전장 유전체의 G+C 함량을 측정할 때, 같은 세균 종에 속하는 균주들간의 G+C 함량은 3 mol% 또는 5 mol% 인 것으로 보고되었다(Mesbah *et al.*, 2011; Meier-Kolthoff *et al.*, 2014). 하지만, 세균 전장 유전체 염기서열을 직접 결정하여 G+C 함량을 분석한 결과 같은 종에 속하는

균주들간의 G+C 함량의 차이는 1 mol% 미만인 것으로 조사되었다(Meier-Kolthoff *et al.*, 2014). 이상의 본 연구 대상인 5개 균주들의 전장 유전자 염기의 G+C 함량을 조사한 결과에 의하면, KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들은 *C. ochracea*에, KCOM 1787 및 KCOM 2046 균주들은 *S. sputigena*에 속하는 것으로 판단된다.

본 연구에서 세균 지방산 조성 분석 결과 KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들의 주요한 지방산은 iso-C15:0 성분(58–67%)인 것으로 조사되었다(Table 15). 이는 *Capnocytophaga* spp.의 표준균주들에서도 iso-C15:0 성분이 52–73%로 가장 높은 비율을 차지하는 것으로 보고되어, 이들 균주들이 *Capnocytophaga* spp. 특성을 갖는 것으로 조사되었다(Table 15). 이들 세균 균주들의 C16:0 30H 성분이 3.0–4.8%와 C18:0 성분이 1.9–2.3%였으며, 이는 *C. ochracea* 표준균주보다 각각 약 2–3배와 6배 정도 적은 비율로 존재함을 알 수 있었다. KCOM 1787과 KCOM 2046 균주들의 지방산 조성 분석결과 C14:0 DMA, C16:1 cis-7, C18:1 at 17.254, C17:1 cis-9/C17:2 및 C15:2/UN 14.762 C15:2 성분들이 약 10% 내외로 가장 많은 비율로 존재하였으며, 이는 기존의 *S. sputigena* 표준균주의 주요 지방산이 C14:0 DMA (35.6%), C15:0 (11.1%) 및 C11:0 (10.9%)인 것과는 차이가 있었다(Table 16). 특히, 이들 *S. sputigena* 표준균주의 주요 지방산인 C14:0 DMA과 C11:0의 조성과는 약 3배 이상 차이가 있었다. 이러한 결과는 전혀 예측하지 못한 결과였기에, 반복 실험하여 결과의 차이가 없었음을 확인하였다(결과는 제시하지 않음). 본 연구에서 한국인 구강에서 분리하여 16S rDNA 염기서열과 전장 유전체 염기서열을 비교 분석하여 *C. ochracea*로 분류된 3개의 균주와 *S. sputigena*로 분류된 2개 균주들의 지방산 조성을 비교 분석한 결과, 기존의 표준균주와 상이한 지방산 조성을 갖는다는 것을 알 수 있었다. 이러한 차이는 현재로서는 명확하게 알 수는 없지만, 세균 배양 조건(배지 성분 등), 지방산 분석 기관의 차이 혹은 균주들이 서식한 숙주의 섭취하는 주식의 차이에 의한 것일 수 있다고 생각된다. 실제로 Moore 등(1994)은 일반적으로 분류학적 그룹 내에서 주요 세포 구성성분 간의 비율은 비교적 균일하지만, 다양한 분류군과 비교분석하려면, 동일한 배양 조건 및 분석 조건을 사용해야 한다는 것을 주장하였다.

하지만, 한국인 구강에서 분리하여 *S. sputigena*로 분류된 2개 균주의 결과는 *S. sputigena* 표준균주와 매우 다른 결과를 보여, 세균배양 조건의 차이에 따른 것으로 판단하기에 어렵다고 생각된다. 그러므로, 향후 연구에서, 좀 더 많은 균주를 대상으로 숙주의 차이에 따른 지방산 조성의 차이가 있는지, 그렇다면 그 이유는 무엇인지에 대한 연구가 필요하리라 생각된다. 그리고, 이러한 차이가 존재한다면, 지방산 조성 분석법은 세균을 종-수준으로 동정하는 분류학연구에서 이용할 필요가 없다는 것을 제안할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서 생화학적 특성을 비교 분석한 결과, KCOM 2191, KCOM 2668, KCOM 2812 균주들은 D-glucose, D-lactose, D-sucrose, D-maltose, D-cellobiose, D-mannose, D-raffinose를 기질로 산을 생성할 수 있었고, 이는 *C. ochracea* 및 *C. endodontalis* 표준균주와 동일한 결과였다(Table 13). 또한 이들 균주들은 모두 esculin 가수분해를 하였다(Table 11과 13). 이들과 다르게 *C. sputigena* ATCC 33612<sup>T</sup> 및 *C. haemolytica* ATCC 51501<sup>T</sup> 표준균주는 D-glucose를 기질로 산을 생성하지 않았으며, 질산염 환원 시험에서 양성반응을 보여 차이가 있었다(Table 13). *C. gingivalis* ATCC 33624<sup>T</sup> 및 *C. granulosa* ATCC 51502<sup>T</sup> 표준균주 또한 D-glucose를 기질로 산을 생성하지 않았으며, esculin 가수분해를 하지 않는 차이점을 보였다(Table 13). KCOM 1787 및 KCOM 2046 균주들은 D-glucose, D-lactose, D-sucrose, D-maltose, D-raffinose 등으로부터 산을 생성할 수 있고, esculin 가수분해능이 있어, *S. sputigena* 표준균주와 동일한 특성을 보였다(Table 11과 14). 하지만, KCOM 2046 균주가 질산염 환원 시험에서 음성반응을 보인 것은, *S. sputigena* 표준균주와 상이한 결과였다(Table 12와 14). 본 연구에서 KCOM 2191, KCOM 2668, KCOM 2812 균주들에게 존재하는 극성 지방 종류는 KCOM 2191 균주에서 한 종류의 phospholipid를 제외하고 동일하였다(Fig. 4). KCOM 2191, KCOM 2668, KCOM 2812 균주들에 존재하는 전자운반체인 퀴논의 종류를 알아본 결과, 세 균주 모두 MK-6를 가지고 있었다(Table 15). 이는 *Capnocytophaga* spp. 들이 MK-6를 가지고 있음과도 일치하였다(Table 15). 다만, KCOM 2191은 MK-6 이외의 또 다른 퀴논을 가지고 있는 것으로 확인되었으며, 이는 다음 연구에서 어떤 종류인지 밝히고자 한다. 이상의 본 연구에서 사용된 균주들의 생화학적 및



화학분류학적 실험 결과, KCOM 2191, KCOM 2668, KCOM 2812 균주들은 *C. ochracea* 표준균주와 유사한 특성을 보였다. KCOM 1787 및 KCOM 2046 균주들도 지방산 조성을 제외하고는 *S. sputigena* 표준균주와 유사하였다.

Leadbetter 등(1979)은 *C. ochracea* 표준균주의 모양을 짧거나 길쭉한 막대모양이며 폭과 길이가  $0.38-0.45 \times 2.5-4.2 \mu\text{m}$ 으로 끝이 둥글거나 가늘다고 설명하였다. 또한 혈액한천배지에서 집락은 얇고 평평하며 가장자리가 고르지 않으며 접종 지점을 넘어 퍼지며 자라는 활공(gliding) 운동성을 보이는 특징을 설명하였다. 이러한 특성이 있는 다른 활공 박테리아 *Cytophaga* spp. 및 *Flexibacter* spp.와의 구별에서 *Capnocytophaga* spp.는 성장에  $\text{CO}_2$ 가 필요하다는 것과 catalase 음성, oxidase 음성인 것으로 확인할 수 있다. KCOM 2191, KCOM 2668, KCOM 2812 균주들의 형태를 관찰한 결과, Leadbetter 등(1979)이 설명한 *C. ochracea* 표준균주의 특징들과 일치하였으며, 5%  $\text{CO}_2$ 의 혐기성 또는 혐기성 환경에서 성장하였으며, 그람염색 결과 음성, catalase 음성을 보였다(Table 11, Fig. 3A-3C). 이들 균체의 폭과 길이는  $0.23-0.31 \times 1.2-12.9 \mu\text{m}$ , 집락의 크기는  $0.2-0.6 \text{ mm}$ 으로 측정되었다(Table 10). Johnson 등(1985)은 *S. sputigena* 표준균주는 절대 혐기성, 운동성이 있고 측면에 편모가 있으며, 끝이 가늘어지는 초승달 모양의 폭과 길이가  $1.3-1.6 \times 1.6-2.4 \mu\text{m}$ 이라고 보고하였다. 2일 동안 혐기성으로 배양된 혈액한천배지에서 집락의 모양은 원형, 직경 약  $0.5 \text{ mm}$ , 볼록, 흰색 및 반투명 모양으로 보고하였다. 본 연구에서 KCOM 1787과 KCOM 2046 균주들의 형태를 관찰한 결과, *S. sputigena* 표준균주와 일치하였으며, 그람염색 결과 음성, 균체의 폭과 길이는  $0.45-0.65 \times 1.4-2.6 \mu\text{m}$ , 편모의 길이는  $4.9-6.9 \mu\text{m}$ , 집락의 크기는  $0.4-1.3 \text{ mm}$ 으로 측정되었다(Table 10, Fig. 3D와 3E). 하지만 균체의 폭 길이는 표준균주와 2-3배 차이가 있었다.

KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들의 최적 성장조건은 각각  $40^\circ\text{C}$ ,  $35^\circ\text{C}$  및  $40^\circ\text{C}$ 에서, pH 7.5-8.0에서, NaCl 0% 농도에서 최적의 성장을 보였다(Table 17). KCOM 2191 균주는 NaCl 2% 농도에서 느린 성장을 보였지만, 배양 3일까지 계속 증식하는 결과를 보여 향후 NaCl 2% 이상의 농도에서 추가 조사가 필요해 보인다(Fig. 5C). KCOM 1787과 KCOM 2046 균주들은 각각  $40^\circ\text{C}$  및

35°C에서, pH 6.5 및 pH 7.5에서, NaCl 0.5% 및 NaCl 0–0.5% 농도에서 최적의 성장을 보였다(Table 17). 이 결과는 Johnson 등(1985)이 보고한 *S. sputigena* 표준균주는 35–37°C에서 최적의 성장을 하지만, 25°C와 45°C에서 성장하지 않았다는 내용과 일치하였다. KCOM 1787 균주는 산성 조건에서 더 성장하는 특성이 있었다. 특히 pH 5에서 느린 성장을 보였지만, 배양 3일까지 계속 증식하는 결과를 보여 향후 pH 5 이하에서의 추가 조사가 필요하다고 생각된다(Fig. 8B).

*C. ochracea*는 치주질환 병소보다는 건강한 상태 또는 치은염이나 경미한 치주염 병소의 치면세균막에서 검출 빈도가 높은 것으로 조사되었다(Scapoli *et al.*, 2015; Duque *et al.*, 2017; Idate *et al.*, 2020). 또한, 급속진행형치주염 환자를 대상으로 한 연구 결과에 의하면, *C. ochracea*는 *P. intermedia*와 *A. actinomycetemcomitans*와 더불어 화농성이 있는 병소에서 그렇지 않은 병소에서 보다 유의성 있게 검출되었다(Kamma *et al.*, 1994). 반면에, *C. ochracea*는 구강 이외의 조직 또는 장기에서 복막염 (Mortensen *et al.*, 1985; Testillano *et al.*, 1989), 세균혈증 혹은 패혈증(Desai *et al.*, 2007; Gilligan *et al.*, 1981; Alhifany *et al.*, 2017; Ito *et al.*, 2016), 심내막염(Buu-Hoi *et al.*, 1988), 골수염(Elster *et al.*, 1983), 고름신장증(pyonephrosis, Tay *et al.*, 1985), 자궁경부농양(Seger *et al.*, 1982), 뇌농양(Wang *et al.*, 2007) 및 패혈관절염(Septic arthritis, Winn *et al.*, 1984) 등의 구강 외 조직 병소에서 검출되었다. 이러한 연구 결과는 *C. ochracea*는 심한 치주염보다는 구강 외 조직의 세균 감염성질환 발병에 더 관여하는 것으로 생각된다. *S. sputigena*는 만성 및 급진성 치주염(chronic and aggressive periodontitis, Nagpal *et al.*, 2016), 전반적 급진성 치주염(generalized aggressive periodontitis, Gonçalves *et al.*, 2012) 병소에서 높은 빈도로 검출됨이 보고되었다. 또한, 급속진행형치주염 환자를 대상으로 한 연구에서 *S. sputigena*는 *P. intermedia*, *Campylobacter concisus*, *Peptostreptococcus micros*와 더불어 자발적 출혈이 있는 곳에서 통계학적으로 유의성있게 검출빈도가 높았다(Kamma *et al.*, 1994). 최근 *S. sputigena*는 *Cryptobacterium curtum*, *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *Mitsuokella dentalis*, *Slackia exigua*, *Solobacterium*

*moorei*, *Treponema lecithinolyticum*, 및 *Synergistes*와 더불어 치주질환의 발병 및 진행에서 새로운 병원체로 소개되었다(Hiranmayi *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2016). 반면에, *S. sputigena*는 구강외 조직의 병소에서는 잘 검출되지 않지만, 패혈증 병소에서 드물게 발견되는 것으로 보고되었다(McCarthy and Carlson, 1981; Pinon *et al.*, 1985; Pomeroy *et al.*, 1987). 이러한 연구결과를 고려할 때, *S. sputigena*가 다른 병원성 세균 종과 더불어 치주염의 질병 발병 및 진행에 관여하지만, 구강외 조직 또는 장기의 세균감염성질환과의 연관성은 비교적 적은 것으로 생각된다. 이처럼, *C. ochracea*와 *S. sputigena* 종들은 구강 및 전신 장기에서 감염성 질환과 관련성이 있는 것으로 보고되었다. 하지만, 현재 이들 세균 종의 병인론 연구는 미미하고, 특히, 유전학적, 형태학적, 생화학적 및 화학분류학적 특성이 밝혀진 한국인 유래 균주들의 연구도 거의 없는 실정이다. 그러므로, 본 연구에서 여러 특성을 밝힌 5개 균주들은 여러 병인론 연구에서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

이상의 연구 결과를 요약하면, 16S rDNA 염기서열 상동성 비교분석법으로 *C. ochracea*와 *S. sputigena*로 임시 동정된 5개 균주들의 전장 유전체 염기서열을 결정하고, 이들의 상동성 비교분석법인 ANI와 GGD 분석 그리고 G+C 함량 비교 분석에 의해, KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들은 *C. ochracea*, KCOM 1787 및 KCOM 2046 균주들은 *S. sputigena*에 속하는 것으로 판단된다. 본 연구 결과에서 얻은 균주들의 형태학적 특성, 생화학적 특성, 지방산 조성, 극성 지방조성, 퀴논 조성 및 최적 성장조건 등의 특성 정보는, 이들 균주들의 보존 및 분류학적 연구에 참고 자료로 사용될 수 있을 것이다. 또한, 이들 균주들은 향후 숙주-세균 상호작용 등과 같은 병인론 연구에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결 론

본 연구는 16S rDNA 염기서열 비교분석법만을 이용하여 *C. ochracea*로 동정된 3개 균주와 *S. sputigena*로 동정된 2개 균주를 한국구강미생물자원은행에서 분양받아, 이들 균주의 전장 유전체 염기서열 상동성 비교분석법을 통하여, 종-수준으로 최종 동정하고자 시행되었다. 또한, 이들의 형태학적, 생화학적, 지방산 조성분석, 퀴논 분석, 극성지방분석 등의 특성을 밝혀 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 전장 유전체 염기서열을 결정하여 상동성을 ANI 분석법으로 분석한 결과, KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주는 *C. ochracea* DSM 7271<sup>T</sup> 표준균주와 약 96.3% 이상의 상동성을 보였으며, KCOM 1787과 KCOM 2046 균주는 *S. sputigena* ATCC 35185<sup>T</sup> 표준균주와 95.3% 이상의 상동성을 보였다. 이때, 비교 대상이 되는 균주가 특정 표준균주에 속하는 ANI 값의 기준은 95% 이상이다.
2. 균주들의 전장 유전체 염기서열의 G+C 함량을 비교 분석한 결과, KCOM 2191 (39.7 mol%), KCOM 2668 (39.3 mol%) 및 KCOM 2812 (39.3 mol%) 균주들은 *C. ochracea* 표준균주 (39.6 mol%)와, KCOM 1787 (56.9 mol%) 및 KCOM 2046 (57.2 mol%) 균주들은 *S. sputigena* 표준균주 (57.1 mol%)와 각각 같은 종의 기준이 되는 1 mol% 미만의 차이를 보였다.
3. 세균 지방산 분석결과, KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들은 iso-C15:0 성분이 각각 57.9%, 67.2%, 64.9%의 비율로 가장 많이 검출되었다. 이는 *C. ochracea* 표준균주와 유사한 결과였다. KCOM 1787과 KCOM 2046 균주들의 지방산 조성 분석결과 C14:0 DMA, C16:1 cis-7, C18:1 at 17.254, C17:1 cis-9/C17:2 및 C15:2/UN 14.762 C15:2 성분들이 약 10% 내외로 가장 많은 비율로 존재하였으며, 이는 기존의 *S. sputigena* 표준균주의 주요 지방산이 C14:0 DMA (35.6%), C15:0 (11.1%) 및 C11:0 (10.9%)인 것과는 차이가 있었다. 향후 연구에서 이러한 차이를 밝히는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

4. 형태학적 특성, 생화학 검사, 퀴논 분석 결과, 본 연구에서 사용된 5개 균주들은 각각의 표준균주와 유사한 특성이 있음을 알 수 있었다.

이상의 연구 결과를 요약하면, KCOM 2191, KCOM 2668 및 KCOM 2812 균주들은 *C. ochracea*, KCOM 1787 및 KCOM 2046 균주들은 *S. sputigena*에 속하는 것으로 판단되고, 이들은 *C. ochracea*와 *S. sputigena*에 의한 사람 구강 및 전신 조직 세포에서의 감염성 질환 발병 기전을 연구하는 데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## VI. 참고 문헌

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721-32. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
- Ahn SH, Song JE, Kim S, Cho SH, Lim YK, Kook JK, Kook MS, Lee TH. NOX1/2 activation in human gingival fibroblasts by *Fusobacterium nucleatum* facilitates attachment of *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Microbiol* 2016;198:573-83. doi: 10.1007/s00203-016-1223-7.
- Alhifany AA, Almgour TA, Tabb DE, Levine DH. Premature labor and neonatal septicemia caused by *Capnocytophaga ochracea*. *Am J Case Rep* 2017;18:674-6. doi: 10.12659/ajcr.903824.
- Antezack A, Boxberger M, Ben Khedher M, La Scola B, Monnet-Corti V. Isolation and description of *Selenomonas timonae* sp. nov., a novel *Selenomonas* species detected in a gingivitis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* 2021;71:5040. doi: 10.1099/ijsem.0.005040.
- Antezack A, Boxberger M, La Scola B, Monnet-Corti V. Isolation and Characterization of *Capnocytophaga bilanii* sp. nov., a Novel *Capnocytophaga* species detected in a gingivitis subject. *Pathogens* 2021;10:547. doi: 10.3390/pathogens10050547.
- Avila-Campos MJ, Rivera IN, Nakano V. Genetic diversity of oral *Fusobacterium nucleatum* isolated from patients with different clinical conditions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48:59-63. doi: 10.1590/s0036-46652006000200001.
- Belkacemi S, Cassir N, Delerce J, Cadoret F, La Scola B. '*Selenomonas massiliensis*,' a new anaerobic bacterial species isolated from human oral microbiota. *New Microbes New Infect* 2018;24:1-3. doi: 10.1016/j.nmni.2018.03.006.
- Bonatti H, Rosboth DW, Nachbaur D, Fille M, Aspöck C, Hend I, Hourmont K,

- White L, Malnick H, Allerberger FJ. A series of infections due to *Capnocytophaga* spp in immunosuppressed and immunocompetent patients. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:380-7. doi: 10.1046/j.1469-0691.2003.00538.x.
- Brenner DJ, Hollis DG, Fanning GR, Weaver RE. *Capnocytophaga canimorsus* sp. nov. (formerly CDC group DF-2), a cause of septicemia following dog bite, and *C. cynodegmi* sp. nov., a cause of localized wound infection following dog bite. *J Clin Microbiol* 1989;27:231-5. doi: 10.1128/jcm.27.2.231-235.1989.
- Bryant MP. The characteristics of strains of *Selenomonas* isolated from bovine rumen contents. *J Bacteriol* 1956;72:162-7. doi: 10.1128/jb.72.2.162-167.1956.
- Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, Asadi H, Ojcius DM. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J* 2019;42:27-35. doi: 10.1016/j.bj.2018.12.001.
- Buu-Hoi AY, Joundy S, Acar JF. Endocarditis caused by *Capnocytophaga ochracea*. *J Clin Microbiol* 1988;26:1061-2. doi: 10.1128/jcm.26.5.1061-1062.1988.
- Cho E, Park SN, Shin Y, Lim YK, Paek J, Kim HK, Hwang CH, Jo E, Jin D, Chang YH, Kook JK. *Peptoniphilus mikwangii* sp. nov., isolated from a clinical specimen of human origin. *Curr Microbiol* 2015;70:260-6. doi:10.1007/s00284-014-0712-7.
- Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi H, Xu XW, De Meyer S, Trujillo ME. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018;68:461-6. doi: 10.1099/ijsem.0.002516.
- Desai SS, Harrison RA, Murphy MD. *Capnocytophaga ochracea* causing severe sepsis and purpura fulminans in an immunocompetent patient. *J Infect* 2007;54:e107-9. doi: 10.1016/j.jinf.2006.06.014.

- Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2837-48. doi: 10.1128/AEM.72.4.2837-2848.2006.
- Dighe AS, Shouche YS, Ranade DR. *Selenomonas lipolytica* sp. nov., an obligately anaerobic bacterium possessing lipolytic activity. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:783-91. doi: 10.1099/00207713-48-3-783.
- Duque C, João MF, Camargo GA, Teixeira GS, Machado TS, Azevedo RS, Mariano FS, Colombo NH, Vizoto NL, Mattos-Graner RO. Microbiological, lipid and immunological profiles in children with gingivitis and type 1 diabetes mellitus. *J Appl Oral Sci* 2017;25:217-26. doi: 10.1590/1678-77572016-0196.
- Ehrmann E, Handal T, Tamanai-Shacoori Z, Bonnaure-Mallet M, Fosse T. High prevalence of  $\beta$ -lactam and macrolide resistance genes in human oral *Capnocytophaga* species. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:381-4. doi: 10.1093/jac/dkt350.
- Elster AD, Macone AB, Kasser JR. Osteomyelitis caused by *Capnocytophaga ochracea*. *J Pediatr Orthop* 1983;3:613-5. doi: 10.1097/01241398-198311000-00008.
- Felix L, Rosenberg A, Caraballo KA, Taborga DP, Hamula C. *Capnocytophaga* spp. infection causing chorioamnionitis: an unusual suspect. *Anaerobe* 2019;59:115-7. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.07.006.
- Frandsen EV, Poulsen K, Könönen E, Kilian M. Diversity of *Capnocytophaga* species in children and description of *Capnocytophaga leadbetteri* sp. nov. and *Capnocytophaga* genospecies AHN8471. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:324-36. doi: 10.1099/ijs.0.65373-0.
- Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000 2013;62:59-94. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x.
- Gilligan PH, McCarthy LR, Bissett BK. *Capnocytophaga ochracea* septicemia.



- J Clin Microbiol 1981;13:643-5. doi: 10.1128/jcm.13.4.643-645.1981.
- Gonçalves LF, Fermiano D, Feres M, Figueiredo LC, Teles FR, Mayer MP, Favari M. Levels of *Selenomonas* species in generalized aggressive periodontitis. J Periodontal Res 2012;47:711-8. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01485.x.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. Int J Syst Evol Microbiol 2007;57:81-91. doi: 10.1099/ijs.0.64483-0.
- Guangsheng C, Plugge, CM, Roelofsen W, Houwen FP, Stams AJ. *Selenomonas acidaminovorans* sp. nov., a versatile thermophilic proton-reducing anaerobe able to grow by decarboxylation of succinate to propionate. Arch Microbiol 1992;157:169-75. doi: 10.1007/BF00245286.
- Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The Polymicrobial Synergy and Dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. Mol Oral Microbiol 2012;27:409-19. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x.
- Hajishengallis G, Lamont RJ. Polymicrobial communities in periodontal disease: Their quasi-organismal nature and dialogue with the host. Periodontol 2000 2021;86:210-30. doi: 10.1111/prd.12371.
- Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. J Dent Res 2013;92:485-91. doi: 10.1177/0022034513487559.
- Hiranmayi KV, Sirisha K, Ramoji Rao MV, Sudhakar P. Novel pathogens in periodontal microbiology. J Pharm Bioallied Sci 2017;9:155-63. doi: 10.4103/jpbs.JPBS\_288\_16.
- Idate U, Bhat K, Kotrashetti V, Kugaji M, Kumbar V. Molecular identification of *Capnocytophaga* species from the oral cavity of patients with chronic periodontitis and healthy individuals. J Oral

- Maxillofac Pathol. 2020;24:397. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_33\_20.
- Ito S, Hagiya H, Kimura K, Nishi I, Yoshida H, Kioka H, Ohtani T, Yamaguchi O, Tanabe K, Tomono K, Sakata Y. *Capnocytophaga ochracea*-related bacterium bacteremia in a hypertrophic cardiomyopathy patient without neutropenia. Intern Med 2016;55:2731-5. doi: 10.2169/internalmedicine.55.6593.
- Jo E, Park SN, Lim YK, Paek J, Shin Y, Kim H, Kim SH, Shin JH, Chang YH, Kook JK. *Capnocytophaga endodontalis* sp. nov., isolated from a human refractory periapical abscess. Curr Microbiol 2018;75:420-5. doi: 10.1007/s00284-017-1397-5.
- Johnson JL, Holdeman LV, Moore WEC. Replacement of the type strain of *Selenomonas sputigena* under rule 18: request for an opinion. Int J Syst Evol Microbiol 1985;35:371-4. doi:10.1099/00207713-35-3-371.
- Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. J Periodontol 1994;65:1073-8. doi: 10.1902/jop.1994.65.11.1073.
- Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. J Dent Res 2014;93:1045-53. doi: 10.1177/0022034514552491.
- Kim JO, Ginsberg J, McGowan KL. *Capnocytophaga meningitis* in a cancer patient. Pediatr Infect Dis J 1996;15:636-7. doi: 10.1097/00006454-199607000-00019.
- Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol 2014;64:346-51. doi: 10.1099/ij.s.0.059774-0. Erratum in: Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64:1825.
- Kook JK, Park SN, Lim YK, Cho E, Jo E, Roh H, Shin Y, Paek J, Kim HS, Kim

- H, Shin JH, Chang YH. Genome-based reclassification of *Fusobacterium nucleatum* subspecies at the species level. *Curr Microbiol.* 2017;74:1137-47. doi: 10.1007/s00284-017-1296-9. Erratum in: *Curr Microbiol.* 2020;77:3807. Erratum in: *Curr Microbiol.* 2021;79:2.
- Kook JK, Sakamoto T, Nishi K, Kim MK, Seong JH, Son YN, Kim DK. Detection of *Tannerella forsythia* and/or *Prevotella intermedia* might be useful for microbial predictive markers for the outcome of initial periodontal treatment in Koreans. *Microbiol Immunol* 2005;49:9-16. doi: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03634.x. Erratum in: *Microbiol Immunol* 2005;49:295.
- Kuete E, Mbogning Fonkou MD, Mekhalif F, Anani H, Baudoin JP, Raoult D, Bou Khalil JY. *Selenomonas felix* sp. nov., a new bacterium isolated from human sputum. *New Microbes New Infect* 2019;31:100567. doi: 10.1016/j.nmni.2019.100567.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35:1547-9. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Kurgan Ş, Kansal S, Nguyen D, Stephens D, Koroneos Y, Hasturk H, Van Dyke TE, Kantarci A. Strain-specific impact of *Fusobacterium nucleatum* on neutrophil function. *J Periodontol* 2017;88:380-389. doi: 10.1902/jop.2016.160212.
- Lai CH, Males BM, Dougherty PA, Berthold P, Listgarten MA. *Centipeda periodontii* gen. nov., sp. nov. from human periodontal lesions. *Int J Syst Evol Microbiol* 1983;33:628-35.
- Lakio L, Lehto M, Tuomainen AM, Jauhiainen M, Malle E, Asikainen S, Pussinen PJ. Pro-atherogenic properties of lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycescomitans*. *J Endotoxin Res* 2006;12:57-64. doi: 10.1179/096805106X89099.
- Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in

- inflammatory disease. Trends Mol Med 2015;21:172-83. doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.004.
- Lan GQ, Ho YW, Abdullah N. *Mitsuokella jalaludinii* sp. nov., from the rumens of cattle in Malaysia. Int J Syst Evol Microbiol 2002;52:713-8. doi: 10.1099/00207713-52-3-713.
- Le Moal G, Landron C, Grollier G, Robert R, Burucoa C. Meningitis due to *Capnocytophaga canimorsus* after receipt of a dog bite: case report and review of the literature. Clin Infect Dis 2003;36:e42-6. doi: 10.1086/345477.
- Leadbetter ER, Holt SC, Socransky SS. *Capnocytophaga*: new genus of gram-negative gliding bacteria. I. General characteristics, taxonomic considerations and significance. Arch Microbiol 1979;122:9-16. doi: 10.1007/BF00408040.
- Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol 2016;66:1100-3. doi: 10.1099/ijsem.0.000760.
- Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, Shin HY, Kook JK. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. J Microbiol 2005;43:260-5.
- Lessel EF Jr, Breed RS. *Selenomonas* Boskamp, 1922; a genus that includes species showing an unusual type of flagellation. Bacteriol Rev. 1954;18:165-8. doi: 10.1128/br.18.3.165-169.1954.
- Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. J Clin Periodontol 1986;13:431-45. doi: 10.1111/j.1600-051x.1986.tb01487.x.
- London J, Celesk RA, Kagermeier A, Johnson JL. Emended description of *Capnocytophaga gingivalis*. Int J Syst Bacteriol 1985;35:369-70.

- doi:10.1099/00207713-35-3-369.
- Mantadakis E, Danilatou V, Christidou A, Stiakaki E, Kalmanti M. *Capnocytophaga gingivalis* bacteremia detected only on quantitative blood cultures in a child with leukemia. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:202-4.
- McCarthy LR, Carlson JR. *Selenomonas sputigena* septicemia. *J Clin Microbiol* 1981;14:684-5. doi: 10.1128/jcm.14.6.684-685.1981.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 2013;14:60. doi: 10.1186/1471-2105-14-60.
- Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Göker M. Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:352-356. doi: 10.1099/ijs.0.056994-0.
- Mesbah NM, Whitman WB, Mesbah M. Determination of the G+C content of prokaryotes. In: *Methods in microbiology*. Academic Press 2011. p. 299-324.
- Minnikin DE, O'donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M, Schaal A, Parlett JH. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* 1984;2:233-41. doi: 10.1016/0167-7012(84)90018-6
- Moore LV, Bourne DM, Moore WE. Comparative distribution and taxonomic value of cellular fatty acids in thirty-three genera of anaerobic gram-negative bacilli. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:338-47. doi: 10.1099/00207713-44-2-338.
- Moore LVH, Johnson JL, Moore WEC. *Selenomonas noxia* sp. nov., *Selenomonas flueggei* sp. nov., *Selenomonas infelix* sp. nov., *Selenomonas diana* sp. nov., and *Selenomonas artemidis* sp. nov., from the human gingival crevice. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:271-80.

- Mortensen JE, LeMaistre A, Moore DG, Robinson A. Peritonitis involving *Capnocytophaga ochracea*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1985;3:359-62. doi: 10.1016/0732-8893(85)90011-2.
- Nagpal D, Prakash S, Bhat KG, Singh G. Detection and comparison of *Selenomonas sputigena* in subgingival biofilms in chronic and aggressive periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol* 2016;20:286-91. doi: 10.4103/0972-124X.181247.
- Offenbacher S, Boggess KA, Murtha AP, Jared HL, Lief S, McKaig RG, Mauriello SM, Moss KL, Beck JD. Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstet Gynecol* 2006;107:29-36. doi: 10.1097/01.AOG.0000190212.87012.96. Erratum in: *Obstet Gynecol* 2006;107:1171.
- Oliveira RR, Fermiano D, Feres M, Figueiredo LC, Teles FR, Soares GM, Favari M. Levels of candidate periodontal pathogens in subgingival biofilm. *J Dent Res* 2016;95:711-8. doi: 10.1177/0022034516634619.
- Paju S, Scannapieco FA. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis* 2007;13:508-12. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01410a.x.
- Parenti DM, Snyderman DR. *Capnocytophaga* species: infections in nonimmunocompromised and immunocompromised hosts. *J Infect Dis* 1985;151:140-7. doi: 10.1093/infdis/151.1.140.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-83. doi: 10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001.
- Piau C, Arvieux C, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. *Capnocytophaga* spp. involvement in bone infections: a review. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41:509-15. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.03.001.
- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*

- 2005;366:1809–20. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67728-8.
- Pinon G, Grollier G, Romet-Lemonne JL, de Rautlin de la Roy Y. Fatal *Selenomonas sputigena* septicemia probably originating from lung abscess. *Eur J Clin Microbiol* 1985;4:343–4. doi: 10.1007/BF02013666.
- Pomeroy C, Shanholtzer CJ, Peterson LR. *Selenomonas* bacteraemia—case report and review of the literature. *J Infect* 1987;15:237–42. doi: 10.1016/s0163-4453(87)92678-8.
- Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 2012;55:21–31. doi: 10.1007/s00125-011-2342-y.
- Queen J, Domingue JC, White JR, Stevens C, Udayasuryan B, Nguyen TTD, Wu S, Ding H, Fan H, McMann M, Corona A, Larman TC, Verbridge SS, Housseau F, Slade DJ, Drewes JL, Sears CL. Comparative analysis of colon cancer-derived *Fusobacterium nucleatum* subspecies: inflammation and colon tumorigenesis in murine models. *mBio* 2022;13:e0299121. doi: 10.1128/mbio.02991-21.
- Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:19126–31. doi: 10.1073/pnas.0906412106.
- Riviere GR, Riviere KH, Smith KS. Molecular and immunological evidence of oral *Treponema* in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:113–8. doi: 10.1046/j.0902-0055.2001.00100.x.
- Sabbatani S, Manfredi R, Frank G, Chiodo F. *Capnocytophaga* spp. brain abscess in an immunocompetent host: problems in antimicrobial chemotherapy and literature review. *J Chemother* 2004;16:497–501. doi: 10.1179/joc.2004.16.5.497.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–25. doi:

- 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sandoe JAT. *Capnocytophaga canimorsus* endocarditis. J Med Microbiol 2004;53:245-8. doi: 10.1099/jmm.0.05274-0.
- Scapoli L, Girardi A, Palmieri A, Martinelli M, Cura F, Lauritano D, Carinci F. Quantitative analysis of periodontal pathogens in periodontitis and gingivitis. J Biol Regul Homeost Agents 2015;29:101-10.
- Scheres N, Crielaard W. Gingival fibroblast responsiveness is differentially affected by *Porphyromonas gingivalis*: implications for the pathogenesis of periodontitis. Mol Oral Microbiol 2013;28:204-18. doi: 10.1111/omi.12016.
- Schleifer KH, Leuteritz M, Weiss N, Ludwig W, Kirchhof G, Seidel-Rüfer H. Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lactificifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1990;40:19-27. doi: 10.1099/00207713-40-1-19. PMID: 1699594.
- Seger R, Kloeti J, von Graevenitz A, Wüst J, Briner J, Willi U, Siegrist H. Cervical abscess due to *Capnocytophaga ochracea*. Pediatr Infect Dis 1982;1:170-2. doi: 10.1097/00006454-198205000-00009. PMID: 7145731.
- Shin YK, Lee JS, Lee K, Chun CO, Kim HJ, Joo WH, Park YH. Isoprenoid quinone profiles in microbial taxonomy. J Life Sci 1995;5:211-7.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998;25:134-44. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x.
- Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic Note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol 1994;44:846-9.



- Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* 2006;33:152-5.
- Suzuki M, Umeda K, Kimura M, Imaoka K, Morikawa S, Maeda K. *Capnocytophaga felis* sp. nov. isolated from the feline oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020;70:3355-60. doi: 10.1099/ijsem.0.004176.
- Tay JS, Chusid MJ, Dunne WM Jr. *Capnocytophaga ochracea* pyonephrosis in an infant with obstructive nephropathy. *Pediatr Infect Dis* 1985;4:555-6. doi: 10.1097/00006454-198509000-00025.
- Testillano Tarrero M, Montejo Baranda M, Ituarte Arizaga J, Moreto Canela M. Peritonitis involving *Capnocytophaga ochracea*. *Am J Gastroenterol* 1989;84:206-7.
- Wang HK, Chen YC, Teng LJ, Hung CC, Chen ML, Du SH, Pan HJ, Hsueh PR, Chang SC. Brain abscess associated with multidrug-resistant *Capnocytophaga ochracea* infection. *J Clin Microbiol* 2007;45:645-7. doi: 10.1128/JCM.01815-06.
- Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. *Peptidylarginine deiminase* from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2662-72. doi: 10.1002/art.27552.
- Winn RE, Chase WF, Lauderdale PW, McCleskey FK. Septic arthritis involving *Capnocytophaga ochracea*. *J Clin Microbiol* 1984;19:538-40. doi: 10.1128/jcm.19.4.538-540.1984.
- Wylensek D, Hitch TCA, Riedel T, Afrizal A, Kumar N, Wortmann E, Liu T, Devendran S, Lesker TR, Hernández SB, Heine V, Buhl EM, M D'Agostino P, Cumbo F, Fischöder T, Wyschkon M, Looft T, Parreira VR, Abt B, Doden HL, Ly L, Alves JMP, Reichlin M, Flisikowski K, Suarez LN, Neumann AP, Suen G, de Wouters T, Rohn S, Lagkouvardos I, Allen-Vercoe E, Spröer C, Bunk B, Taverne-Thiele AJ, Giesbers M, Wells JM, Neuhaus

- K, Schnieke A, Cava F, Segata N, Elling L, Strowig T, Ridlon JM, Gulder TAM, Overmann J, Clavel T. A collection of bacterial isolates from the pig intestine reveals functional and taxonomic diversity. *Nat Commun* 2020;11:6389. doi: 10.1038/s41467-020-19929-w.
- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000a;27:648-57. doi: 10.1034/j.1600-051x.2000.027009648.x.
- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000b;27:722-32. doi: 10.1034/j.1600-051x.2000.027010722.x.
- Yamamoto T, Kajiura S, Hirai Y, Watanabe T. *Capnocytophaga haemolytica* sp. nov. and *Capnocytophaga granulosa* sp. nov., from human dental plaque. *Int J Syst Bacteriol* 1994 Apr;44:324-9. doi: 10.1099/00207713-44-2-324. PMID: 8186098.
- Yan X, Yang M, Liu J, Gao R, Hu J, Li J, Zhang L, Shi Y, Guo H, Cheng J, Razi M, Pang S, Yu X, Hu S. Discovery and validation of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *Am J Cancer Res* 2015;5:3111-22.
- Zangenah S, Abbasi N, Andersson AF, Bergman P. Whole genome sequencing identifies a novel species of the genus *Capnocytophaga* isolated from dog and cat bite wounds in humans. *Sci Rep* 2016;6:22919. doi: 10.1038/srep22919.
- Zhang K, Dong X. *Selenomonas bovis* sp. nov., isolated from yak rumen contents. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:2080-3. doi: 10.1099/ijs.0.007641-0.
- Zhang Y, Qiao D, Shi W, Wu D, Cai M. *Capnocytophaga periodontitidis* sp. nov., isolated from subgingival plaque of periodontitis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* 2021;71. doi: 10.1099/ijsem.0.004979.