

## 한국인의 분변으로 부터 *Bacteroides*를 분리하기 위한 선택 배지 조사

지근억 · 김인희 · 이세경  
한림대학교 식품영양학과

### Investigation of Selective Medium for Isolation and Enumeration of *Bacteroides* sp. from the Feces of the Korean People

Geun-Eog Ji, In-Hee Kim and Se-Kyung Lee

Department of Food Science and Nutrition, Hallym University

#### Abstract

Vancomycin inhibited the growth of the most large intestinal bacteria other than *Bacteroides* sp. and *E. coli*. Since *Bacteroides* are predominant compared with *E. coli* in the large intestinal tract of the adult, vancomycin-added medium(VA) was shown to be an effective selective medium for *Bacteroides*. VA showed comparable or better selectivity for *Bacteroides* sp. to NBGT which is being used currently as a most frequently used selective medium for *Bacteroides* in Japan.

Key words: *Bacteroides*, selective medium, vancomycin

#### 서 론

*Bacteroides* sp.는 편성 혐기성균으로 유아기 이후로 부터 노년에 이르기까지 인체의 장내에 가장 많이 존재하는 균이다<sup>(1,2)</sup>. 또한 장외의 장기로부터의 임상검체나 수술후 감염에 관여하는 기회 감염균으로써도 혐기성균 중 가장 높은 빈도를 차지하고 있다<sup>(3,4)</sup>. 장내의 *Bacteroides* sp.는 인체에 유익한 작용과 유해한 작용을 동시에 갖고 있다고 생각되고 있다. 장내에서 미생물의 발효기질은 식이섬유를 포함한 다당류와 장점막으로 부터 분비되는 mucin 등이 주를 이루고 있는데 *Bacteroides*는 이들 성분들의 일부에 대한 분해 및 이용성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다<sup>(5,6)</sup>. 한편 식이섬유의 섭취가 적고 지방질의 섭취가 많은 서양식 위주의 식사를 섭취하는 경우에는 대장과 분변에 장내균총이 생산하는  $\beta$ -glucuronidase, nitroreductase 등의 발암물질 생성효소 활성이 높은 것으로 보고되었는데<sup>(7,8)</sup>, *Bacteroides*는 이들 효소들을 생성하는 균주로 알려져 있다. 이와 같이 인간의 장내 정상균총 중 가장 많이 존재하고 생리적으로 매우 중요한 균임에도 불구하고 우리나라 사람들의 대장 상재균총인 *Bacteroides*에 대한 연구는 지와 이<sup>(9)</sup>의 보고가 있을 뿐이다. 현재 대장의 기능을 향상시키는 여러가지 기능성 식품들이 판매 및 개발되고 있는 시점에서 앞으로 우리나라에서 자체적으로 1) 한국인의 대장 상재균총

조사 2) 식품, 의약품 및 환경 인자들이 장내의 상재균총에 미치는 영향 평가 3) 다양한 질병과 장내균총과의 상관관계 평가 4) 장내로부터의 유용 균주를 효율적으로 탐색 및 선별할 수 있기 위하여는 우리나라 사람들에게 알맞는 장내균 선택 배지를 개발하는 것이 우선이라 하겠다. 그러나 아직은 한국인에 대한 선택배지가 조사되어 있지 않기 때문에 본 연구에서는 *Bacteroides* 선택배지에 대한 조사를 하여 보고하는 바이다.

#### 재료 및 방법

##### 재료 및 사용균주

실험에 사용된 각종 항생제 및 대사저해제는 Sigma 회사로부터 구입하였다. 또한 여러 종류의 PNP(para-nitrophenol)-glycoside들도 Sigma회사로부터 구입하였다. 항생제에 대한 내성 검사시 기준 균주로 사용한 *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703, *B. longum* ATCC 15707, *B. infantis* ATCC 15697, *B. bifidum* ATCC 29521, *Eubacterium limosum* ATCC 8486, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Cl. ramosum* ATCC 25582, *Cl. butylicum* ATCC 19398, *Escherichia coli* ATCC 11775 등은 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하였고 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3145는 한국과학기술연구원 유전자 은행으로부터 분양받았다.

##### 균주의 분리

여러 연령대에 걸쳐 지원자로부터 대변을 받는 즉시

Corresponding author: Geun-Eog Ji, Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon, Kangwondo 200-702, Korea

**Table 1. Composition of BL agar medium**

Component	Amount
Lab-lemco powder (Oxoid)	2.4 g
Proteose peptone No.3	10.0 g
Tryptone	5.0 g
Bacto-soytone	3.0 g
Yeast extract	5.0 g
Liver extract*	150 ml
Glucose	10.0 g
Soluble starch	0.5 g
Solution A**	10 ml
Solution B**	5 ml
Tween 80	1 ml
Bacto-agar	15.0 g
L-cysteine · HCl	0.5 g
Horse blood	50 ml
D.W	850 ml

pH 7.2

**Solution A;		***Solution B;	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
D.W	250 ml	NaCl	0.5 g
		MnSO <sub>4</sub>	0.34 g
		D.W	250 ml

\*Liver extract was prepared as follows: Liver powder of 10g was dissolved in D.W of 170 ml and extracted about 1 hour in water bath of 50~60°C. The extract was boiled for a few minutes and adjusted to pH 7.2 and filtered.

혐기성 희석용액으로 십진적 희석을 행한뒤 분리과정을 행하였다. 사용된 혐기성 배양은 Anaerobic Jar(BBL), Anaerobic Controlled Glove Box(Lab Line Instrument, Inc., U.S.A), Steel-Wool Method을 사용하였다. *Bacteroides*를 분리하기 위하여 사용된 비선택배지 및 선택배지 제조를 위한 기본배지로 BL(Table 1)과 EG(Table 2)를 사용하였으며 기존의 선택배지로는 NBGT(Table 2)를 사용하였다<sup>10)</sup>. *Bacteroides* 이외의 균주들의 분리도 Mitsuoka의 방법에 따랐다<sup>10)</sup>. 분리된 균주들은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>11)</sup>과 Mitsuoka의 'A Color Atlas of Anaerobic Bacteria'에 준하여 동정하였다. 분리된 균주에 대한 액체 배양을 위하여는 BHI (Brain Heart Infusion)배지를 사용하였고 발효능 실험용 배지로는 PYF배지를 사용하였다<sup>10)</sup>. 이때 첨가된 당들은 10% 용액을 0.45 µm membrane filter(Gelman Sciences)로 여과한 후 최종 농도가 0.5% 되도록 조정하여 사용하였다. 발효산물 중 휘발성 지방산과 설탕의 조성을 조사하기 위하여는 glucose가 첨가된 발효능 실험용 PYF 배지에서 생산된 산을 gas chromatography(Hewlett Packard HP 5890A GC, 530 µm HP-20M column)를 사용하여 분석하였다.

#### 분리균주의 효소 spectrum 비교

각 분리 균주의 효소 spectrum은 지와 이의 방법<sup>10)</sup>을

**Table 2. Composition of EG, NBGT and VA agar medium**

#### A) EG agar medium

Component	Amount
Lab-lemco powder (Oxoid)	2.4 g
Proteose peptone No.3	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0 g
Glucose	1.5 g
Starch, soluble	0.5 g
L-cystine	0.2 g
Silicon antifoamer	1 ml
Bacto-agar	15.0 g
L-cysteine-HCL	0.5 g
Horse blood	50 ml
D.W	1000 ml

pH 7.6~7.8

#### B) NBGT agar medium

One gram of sodium taurocholate, 1.0 ml of 0.1% brilliant green solution and 0.2 g of neomycin sulfate was dissolved into 15 ml of water. NaOH solution(10%) was added until the color of the solution turned green. After adjusting the final volume to 20 ml, the solution was mixed with 1 liter of A) medium.

#### C) VA agar medium

1.5 mg of vancomycin was added into 1 liter of A) medium

이용하여 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### *Bacteroides* 균주의 분리

*Bacteroides*는 BL 비선택배지에서 무색 또는 회색의 집락을 형성하며 자라고, Mitsuoka가 개발한 NBGT 선택배지에서 자라는 균은 대부분 *Bacteroides*이므로 BL 배지와 NBGT 배지상에서 *Bacteroides*를 분리하였다. 분리된 균주들에 대하여 편성혐기성 그림음성 간균으로 포자를 형성하지 않으며 fructose-6-phosphoketolase(F6 PPK) 음성으로 acetic acid, propionic acid, lactic acid 등을 주요 발효 산물로 생산하였을 때 최종적으로 *Bacteroides*에 속하는 것으로 확정하였다.

### 분리된 *Bacteroides* 균주들에 대한 항생제 및 대사저해제의 작용검사

10여명의 한국인들로부터 분리 동정된 *Bacteroides* 균주들을 대상으로 여러가지 항생제에 대한 감수성을 BL과 EG를 기본배지로 하여 조사한 결과 EG배지에서 감수성이 큰 것으로 나타났다(Table 3). 이러한 양상은 *Bifidobacterium*과 *Eubacterium*도 마찬가지였다(data not shown). 본 연구에서는 감수성이 일반적으로 큰 EG배지를 기본배지로 하여 *Bacteroides*에 대한 선택배지를 조사하였다. Mitsuoka가 개발한 NBGT배지는 1리터의

EG배지에 1 mg의 brilliant green, 1g sodium taurocholate, 200 mg neomycin sulfate를 첨가한 것이나 본 실험결과 brilliant green과 neomycin sulfate는 각각 *Bacteroides*에 대한 선택성이 vancomycin에 비하여 저조한 것으로 나타났다. 즉 neomycin(200 mg/l)은 장내 주요 균종인 *Eubacterium*과 한국인으로부터 분리된 *Bifidobacterium*(data not shown)에 대한 사멸률이 낮았고 brilliant green(4 mg/l)은 *Eubacterium*과 *Bifidobacterium* 및 *Clostridium* 등에 대하여 사멸률이 낮았다. 본 연구에서는 조사하지 않았지만 Mitsuoka의 NBGT작용은 brilliant green과 neomycin sulfate 및 sodium taurocholate의 복합적인 작용에 대한 것으로 생각된다. 그러나 EG에 vancomycin을 첨가하여 만든 VA(vancomycin-added medium, Table 2)배지와 NBGT배지 모두 항생제를 기초로하여 만든 배지이기 때문에 일부의 *Bacteroides*는

사멸되는 것으로 나타났다(Table 4). 김 등<sup>12)</sup>의 조사에서 *Bifidobacterium*에 대한 선택배지 조제시 *Bifidobacterium*만이 이용하는 선택적 기질을 사용하여 우수한 *Bifidobacterium* 선택배지를 만들 수 있었던 것에 비추어 앞으로 *Bacteroides*에 대하여도 항생제보다는 선택적 기질을 이용한 선택배지 개발이 요구된다고 하겠다. Kanamycin(100 mg/l)도 *Bacteroides* 이외의 여러 균주를 저해하였기 때문에 VA배지에 kanamycin을 첨가하여 조사하였으나 vancomycin과 kanamycin을 혼합 첨가하였을 경우 선택되는 *Bacteroides* 숫자가 줄어들었다(data not shown). 이때 첨가되는 kanamycin의 양을 10 mg/l에서 100 mg/l로 단계적으로 올렸을 때 자라는 *Bacteroides* 집락의 숫자는 점차적으로 줄어들었다. 위와같이 vancomycin은 *Bacteroides* 이외의 대부분의 균을 사멸시키는 좋은 선택성을 나타냈지만 그람음성 간균인 *E. coli*를

**Table 3. Susceptibility of intestinal anaerobic bacteria to antimicrobial agents using EG as basal medium**

Antibiotics Bacteria		neomycin (200 mg/l)	kanamycin (100 mg/l)	oleandomycin (10 mg/l)	streptomycin (500 mg/l)	nalidixic acid (200 mg/l)
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	-	+	-	-	+
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	-	+	-	-	-
<i>B. infantis</i>	ATCC 15697	-	-	-	-	+
<i>B. bifidum</i>	ATCC 29521	-	-	-	-	+
<i>Bacteroides</i> isolated from non-selective media		25/30*	23/30	7/35	11/20	18/25
<i>B. fragilis</i>	ATCC 25285	+	-	-	w	+
<i>Bacteroides</i> isolated from selective media		20/28	23/25	15/28	17/20	19/28
<i>Eu. limosum</i>	ATCC 8486	+	-	-	+	+
<i>Cl. perfringens</i>	ATCC 13124	-	+	+	-	-
<i>Cl. ramosum</i>	ATCC 25582	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	ATCC 11775	-	-	+	-	-
<i>Cl. butylicum</i>	ATCC 19398	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i>	KCTC 3145	-	-	-	-	-

**Table 3. (Continued)**

Antibiotics Bacteria		crystal violet (7 mg/l)	taurocholate (100 mg/l)	vancomycin (5 mg/l)	brilliant green (4 mg/l)	lincomycin (1 mg/l)
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703	-	+	-	+	-
<i>B. longum</i>	ATCC 15707	-	+	-	-	-
<i>B. infantis</i>	ATCC 15697	-	+	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	ATCC 29521	-	+	-	-	-
<i>Bacteroides</i> isolated from non-selective media		17/25	36/36	19/25	17/25	6/23
<i>B. fragilis</i>	ATCC 25285	-	-	+	-	-
<i>Bacteroides</i> isolated from selective media		14/28	36/36	22/27	14/27	8/25
<i>Eu. limosum</i>	ATCC 8486	+	+	-	+	-
<i>Cl. perfringens</i>	ATCC 13124	+	-	-	+	-
<i>Cl. ramosum</i>	ATCC 25582	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	ATCC 11775	+	+	+	+	+
<i>Cl. butylicum</i>	ATCC 19398	+	-	-	+	-
<i>L. acidophilus</i>	KCTC 3145	-	-	-	+	-

\*represents the number of strains resistant (numerator) out of strains tested (denominator).

**Table 4. Enumeration of *Bacteroides* spp. using non-selective and selective media (log of cfu/wet gram feces)**

Subject		38 days	3 years	9 years	26 years	34 years	37 years	Average
Medium used		bottle-fed male	male	male	female	female	male	
Non-selective medium	BL	8.5	10.3	10.2	10.7	10.5	10.5	10.1
Selective medium	VA	7.9	10.1	9.9	9.8	10.2	10.4	9.6
	NBGT	7.0	10.2	9.1	10.3	10.3	10.3	9.4

사멸시키지 못하였다. 그러나 대장균은 성인을 비롯한 대부분의 연령층에서 *Bacteroides*에 비하여 1% 이하로 존재하기 때문에 선택배지상에서 큰 문지는 되지 않았다. 또한 대장균은 배지를 호기적으로 배양하였을 때 잘 자라지만 *Bacteroides*는 호기적으로는 자라지 못하기 때문에 쉽게 구별할 수 있었다.

#### VA배지와 NBGT를 이용한 한국인의 *Bacteroides*균주에 대한 선택성 비교

본 연구에서 개발된 VA배지와 Mitsuoaka에 의하여 개발된 NBGT배지를 이용하여 한국인의 분변중에 있는 *Bacteroides*균수를 비교하였다(Table 4). BL배지는 비선택배지로서 BL배지에서 혐기적으로 자라는 균들중 그람음성 간균들은 대부분 *Bacteroides*로 동정되었기 때문에 BL배지에서 자란 콜로니들을 직접 조사하여 *Bacteroides*의 균수를 세었다. BL배지에서 자란 *Bacteroides*는 평균적으로 1g 습윤 분변당  $3 \times 10^{10}$  정도의 CFU(colony forming units)를 보여주었다. 이 숫자는 보고된<sup>(13)</sup> 일본인과 미국인의 *Bacteroides* 균수와 비슷한 수준으로서 이는 본 연구에서의 혐기적인 배양이 효율적으로 이루어졌음을 나타내고 있다. *Bacteroides*는 인체의 분변중 가장 많이 존재하는 균으로서 한국인에서도 유아기 이후로 부터 성인에 이르기 까지 가장 많이 존재하는 것으로 조사되었다<sup>(14)</sup>. 조사결과 VA배지와 NBGT배지는 매우 유사한 값을 나타내었다. VA배지중에 첨가된 vancomycin의 양은 1.5 mg/l로서 Table 3의 선택성 조사시 사용한 5 mg/l 보다 낮은 농도를 사용하였다. 그러나 Vancomycin의 양을 1.5 mg/l 이하로 낮추었을 때 *Bacteroides*이외의 혐기성 균들의 증식이 나타나 선택 배지로서 사용할 수 없게 되었다. VA배지는 첨가제가 vancomycin 하나만 들어가기 때문에 배지의 조제가 간단한 것이 장점이라고 할 것이다. 그러나 VA배지와 NBGT 배지 모두 비선택 배지인 BL배지에 비하여 약 30~50%의 *Bacteroides*가 자랐다. 이는 분변중에 있는 *Bacteroides*중 정지기 또는 사멸기에 접어든 경우이거나 스트레스 상태에 있는 *Bacteroides*들이 항생제 스트레스에 의하여 사멸률이 증가된 것이기 때문이라고 생각된다. Mitsuoaka의 보고에서도 NBGT 선택배지에서 자란 *Bacteroides*의 콜로니 숫자는 비선택 배지인 EG와 BL배지에서

자란 *Bacteroides*의 콜로니 숫자에 비하여 작은것으로 보고되었고 이와같은 이유로 분변중의 *Bacteroides* 숫자를 조사하기 위하여 항상 NBGT배지와 BL 및 EG배지를 병용하여 사용하여 왔다. 궁극적으로 앞에서 언급한 바와 같이 항생제가 첨가되지 않은 *Bacteroides* 선택배지 개발이 제일 바람직한 일일 것이라고 생각된다. 특히 분유를 먹고 자라는 인공유아를 대상으로 장내균총 조사시 대장균의 숫자가 *Bacteroides* 숫자보다 많은 경우들이 있다<sup>(13,14)</sup>. 이들의 분변 균총 조사시에 NBGT배지는 *Bacteroides*를 선택적으로 배양시키지 못하고 오히려 현저히 사멸시키는 경우들이 다수 있는데 이런 경우 VA배지에서는 자라는 *Bacteroides*의 집락수가 NBGT에 비하여 현저히 많았다. 그러나 VA배지에서는 *Bacteroides*의 집락 크기가 대장균의 집락 크기보다 적기 때문에 유아를 대상으로 조사할 경우에는 반드시 콜로니에 대하여 호기적 배양 가능성 및 그램 염색성을 조사하여 *Bacteroides* 콜로니임을 확인하는 것이 필요하다. 결론적으로 한국인의 *Bacteroides*를 대상으로 선택배지를 조제하였을 때 성인의 경우 VA배지는 NBGT배지와 비슷한 수준의 선택성을 나타냈고 어린이의 경우에는 VA배지가 NBGT배지보다 *Bacteroides* 선택성이 양호하였으며 배지 조제가 VA배지는 간단하다는 장점을 갖고 있다.

## 요 약

*Bacteroides*는 대장의 상재균총 중 가장 많이 존재하는 균이다. 본 연구에서는 *Bacteroides*를 분리하여 동정하고 이들 균주들에 대하여 BL배지와 EG배지를 기본 배지로 하여 항생제 및 대사저해제에 대한 감수성 조사를 한 결과 vancomycin은 *Bacteroides*와 대장균 이외의 장내 균들의 생육을 저해하는 것으로 나타났다. 성인에서 대장균은 *Bacteroides*에 비하여 숫적으로 훨씬 적게 존재하기 때문에 vancomycin이 첨가된 VA배지를 선택배지로 조제하여 한국인을 대상으로 기존의 NBGT 선택배지와 비교한결과 선택성이 거의 동일한 것으로 나타났고 유아의 경우에는 VA배지가 NBGT보다 우수하였다.

## 감사의 말

본 연구는 1992년 과학재단 특정 기초 연구비(92-59-

00-02)의 지원에 의하여 이루어진 결과의 일부로써 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Cummings, J.H. and Macfarlane, G.T.: The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 443(1991)
2. Mitsuoka, T.: Taxonomy and ecology of Bifidobacteria. *Bifidobact. Microll.*, 3, 11(1984)
3. Goldin, B., Lichtenstein, A.H. and Gorbach, S.L.: The roles of the intestinal flora in *Modern Nutrition in Health and Disease*, Maurice E. Shills, and Vernon R. Young (ed.), pp.500(1988)
4. Gorbach, S.L. and Bartlett, G.J.: Anaerobic infection. *N. Engl. J. Med.*, 290, 1177(1974)
5. Hoskins, L.C., Agustines, M., Mckee, W.B., Boulding, E.T., Kriaris, M. and Niedermeyer, G.: Mucin degradation in human colon ecosystems. *J. Clin. Invest.*, 75, 944(1985)
6. Salyers, A.A., West, S.E.H., Vercellotti, J.R. and Wilkins, T.D.: Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 529(1977)
7. Wynder, E.L.: The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res.*, 35, 3388(1975)
8. Goldin, B., Dwyer, J., Gorbach, S., Gordon, W. and Swenson, L.: Influence of diet and age on fecal bacterial enzymes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31, S136(1978)
9. 지근역, 이세경: 한국인의 분변으로부터 분리된 *Bacteroides fragilis* Roid8의 Glycosidase 패턴. 한국식품과학회지, 25, 191-195(1993)
10. Mitsuoka, T.: A color atlas of anaerobic bacteria (second ed.) pp.319-327(1984)
11. Sneath, P.H.A., Nicholas, S.M., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, vol.2. William and Wilkins, Baltimore(1986)
12. 김인희, 이세경, 지근역: 한국인을 대상으로 한 *Bifidobacterium*의 선택배지 조사. 한국식품과학회 추계학술 발표(1993)
13. 光岡之足: 腸内細菌學. 東京, 朝倉書店(1990)
14. 지근역: 한국인의 장내 균총 조사 및 분포. 한국산업미생물학회 춘계학술발표(1994)

---

(1994년 1월 24일 접수)