

한국인 장관과 유산균 식품 유래 *Bifidobacterium*의 항생제 내성 특성

문보연 · 이시경¹ · 박종현*

경원대학교 생명공학부, ¹건국대학교 응용생물화학과

Antibiotic Resistant Characteristics of *Bifidobacterium* from Korean Intestine Origin and Commercial Yoghurts

Bo-Youn Moon, Si-Kyung Lee¹, and Jong-Hyun Park*

Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

¹Department of Applied Biology and Chemistry, KonKuk University

Abstract To obtain antibiotic resistant profiles of *Bifidobacterium*, minimum inhibitory concentrations (MIC) of 14 antibiotics for 93 *Bifidobacterium* isolates from Korean intestine origin were determined. All strains tested were sensitive to chloramphenicol, rifampicin, and amoxicillin, whereas resistant to aminoglycoside family, nalidixic acid, and vancomycin. Among vancomycin-resistant strains, 34% were resistant at more than 100 µg/mL, and showed variant resistances toward tetracycline, erythromycin, and penicillin. Their resistances against penicillin, cephalothin, and tetracycline were higher than ten years ago. MIC of ten isolates from commercial yoghurt products were very similar to those of strains from Korean intestine origin, and 20% strains showed resistance at higher than 100 µg/mL vancomycin. These results indicated patterns of antibiotic resistance against *Bifidobacterium* from Korean intestine origin and commercial yoghurts were very similar, and prevalence of vancomycin resistance for *Bifidobacterium* was 20%. To develop new probiotic, antibiotic resistance of vancomycin and risks involved should be evaluated.

Key words: *Bifidobacterium*, antibiotic resistance, vancomycin, human intestine origin strain, commercial yoghurt strains

서 론

*Bifidobacterium*은 그람 양성, 편성 혐기성 세균으로 인체의 장관 주요 균총 중의 하나로서 비타민, 아미노산, 단백질 등의 장내합성뿐만 아니라 면역강화, 소화촉진 등의 유익한 작용을 하고 장내세균을 안정화 시킬 수 있는 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(1). 이 세균은 정상인의 장관에서 초산과 젖산 등의 유기산을 생성하여 장관 부패세균의 성장을 억제할 뿐 아니라(2) 대장에서 병원성 균의 생육 억제와 암 발생을 줄이는 효과가 있다(3). 또한 설사, 변비 등의 장 질환에 많은 유익한 효과가 있는 것으로 알려져 현재 다른 lactic acid bacteria와 함께 probiotics로써 발효유 등에 많이 사용되고 있다(4).

그러나 이러한 여러가지 유익한 측면에서의 장점과 아울러 고려되어야 하는 것은 probiotics의 기회 감염균으로의 가능성에 대한 고려이다. 특히 면역이 완전히 형성되어 있지 않거나 일시적으로 약화되어 있는 사람들에게는 감염될 가능성이 제시되었다(5). *Streptococcus*, *Lactobacillus* 등이 심내막염(endocarditis) 수술 후에 감염된 것으로 보고되었는데(6) 이들 유산균의 감염은 주로 장 서식 균총에 의해 일어나고 있는 반면에 식품이나 생균제제

로 활용되는 균주에서는 장 정착성이 크지 않아 그 가능성이 적은 것으로 보인다(7). 그러나 최근의 유산균 식품에 활용되는 probiotics의 개발은 장관의 정착성을 높이는 노력이 이루어지고 있어서 이들 세균의 장 정착성은 그만큼 높아 지고 있는 것으로 보인다(8).

질병예방 및 치료의 목적으로 사용되고 있는 항생제는 매년 그 사용빈도와 농도가 증가하는 추세에 있고, 무분별한 항생제 오·남용으로 내성균주가 증가해 오히려 질병예방 및 치료에 문제점이 되고 있다. 또한 축산물의 경우 항생제 잔류 문제로 사람의 건강까지 위협하는 상황을 초래하고 있어 외국의 경우에는 사료 첨가 항생제의 사용을 엄격히 규제하여 가고 있는 실정이다. 근래에 문제가 되고 있는 *Enterococcus spp.*는 장관 세균총의 균형을 개선하고, 사람과 동물의 장염의 치료등을 위한 probiotics로 알려져 왔으나 균혈증, 심내막염 등을 유발시키는 기회감염 세균으로 인식되기 시작했다. 이러한 이유는 이 세균이 대부분의 현재 사용하고 있는 항생제에 내성을 가지게 되기 때문인 것이 그 한가지 이유가 될 수 있는 것으로 보고되었다(9). *Enterococcus*는 그의 유전자 전이(gene transfer) 특성으로 관심의 대상이 되었고 특히 vancomycin-resistant enterococci의 위해 가능성이 보고되고 있다(10). 많은 lactobacilli는 vancomycin에 저항성을 보이고 이들 유전자가 염색체에 존재하는 것으로 알려져 있어 *in vivo* 상에서 이러한 세균의 유전자 전이가 일어나는지는 확실치 않다(11). 그러나 이와 같은 유전자 전이는 플라스미드 뿐만 아니라 장 바이러스에 의하여서도 이루어지는 것으로 보고되었다(12).

따라서 새로운 probiotics를 개발하기 위해서는 유익한 효과와 아울러 인체내로의 침투성, 병원성과 항생제 내성 특성 등이 고

*Corresponding author: Jong-Hyun Park, Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Sujeong-Gu, Seongnam-Si, Kyunggi-Do 461-701, Korea

Tel: 82-31-750-5523

Fax: 82-31-750-5501

E-mail: p5062@kyungwon.ac.kr

Received December 25, 2005; accepted March 15, 2006

려 되어야 할 것으로 보인다. 본 연구는 현재 산업적으로 활용되고 있는 *Bifidobacterium*의 항생제 내성특성을 분석함과 아울러 장내 유익한 세균인 *Bifidobacterium*을 한국인 장내에서 분리하여 항생제 감수성 테스트를 수행하여 그 내성 형태를 분석하여 새로운 probiotics 개발을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

Bifidobacterium spp.와 항생제

사용된 *Bifidobacterium* spp.는 한국인의 성인, 유아의 분변으로부터 분리되어 당 연구실에 보관 중인 93개의 *Bifidobacterium* collection과 시중에 유통중인 유산균 음료 13종으로부터 분리한 10균주를 사용하였다. 유산균 음료에서의 분리는 이 음료를 선택 배지에 도말한 후 혐기상태에서 37°C, 24-48시간 배양하여 단일 집락의 특성으로 일차적으로 분리하였다. 이렇게 분리된 단일 집락을 다시 선택배지에서 37°C, 24시간 동안 배양한 후 순수 단일 집락을 취하여 현미경 하에서 *Bifidobacterium*의 형태학적인 특징, Gram염색, F-6-PPK test를 통하여 *Bifidobacterium* spp.로 동정하였다. 선택배지로는 BS배지와 TP배지를 이용하였고(13), 혐기배양은 혐기배양조(BBL, Franklin Lakes, USA)와 혐기 배양 장치(Lab Line Instrument Inc., Iowa, USA)를 사용하였다. 분리된 균주는 항생제 테스트를 위하여 *Lactobacilli* MRS broth(Criterion, CA, USA)에 접종하여 혐기적인 조건에서 37°C, 24시간 동안 배양하여 사용하였다.

사용한 항생제는 총 14종으로 penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cephalothin, neomycin, kanamycin, streptomycin, paromomycin, nalidixic acid, vancomycin, erythromycin, tetracycline, rifampicin, chloramphenicol(Sigma, St. Louise, USA)이며, 이들 항생제는 규정된 용매에 녹인 후 -20°C에서 보관하였다. 항생제 테스트를 위한 배지는 0.05% L-cysteine이 첨가된 *Lactobacilli* MRS agar plate(Criterion, CA, USA)에 -20°C에서 냉동 보관된 항생제를 각 농도별로 조절하여 첨가하였다.

항생제 테스트

항생제 테스트는 환천 희석방법을 이용하여 수행하였다(14). 혐

기적으로 배양한 103균주의 분리 균주를 0.05% L-cysteine이 함유된 MRS 한천배지에 항생제를 단계별로 희석하여 첨가한 배지에 접종기구를 이용하여 접종한 후 혐기적인 조건하에 37°C에서 48시간 배양하였다. 최소 생육저해 농도(minimum inhibition concentration, MIC)는 각각의 항생제가 첨가된 배지에서 균주가 증식하지 않는 최소 농도로 결정하였다.

결과 및 고찰

인체장관유래의 *Bifidobacterium*의 항생제 내성 특성

β-lactams계 항생제 내성특성: 인체장관유래에서 분리된 93개의 *Bifidobacterium*에 penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cephalothin 4 종류의 β-lactams계 항생제 내성 특성의 분석은 Table 1과 같다. Penicillin G에 대한 MIC의 농도는 대부분의 균주가 1 µg/mL 이하의 농도에서 저해되었으나 100 µg/mL 이상에서도 생육이 가능한 균주도 14%로 나타났다. Ampicillin과 amoxicillin도 penicillin G와 비슷한 형태를 보여주었고, cephalothin은 1 µg/mL 보다 큰 균주가 87%로 다른 β-lactams계 항생제보다 내성의 정도가 높다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 penicillin G의 MIC의 농도가 1 µg/mL 이하 이었던 Lim(15)의 결과와 비교했을 때 1 µg/mL에서 100 µg/mL까지 고르게 분포하고 있으며 100 µg/mL 보다 큰 균이 14%나 검출된 것으로 보아 내성률이 높아짐을 알 수 있었다. Cephalothin 또한 6.25-25 µg/mL의 cephalothin 농도범위 보다는 높아진 것으로 보아 1세대 항생제인 cephalothin과 penicillin의 항생제 농도가 높아졌다는 것을 확인할 수 있었다(16,17). 그러나 보다 더 정확한 비교를 위해서는 이들 균주간 직접적인 비교가 요망된다.

Aminoglycoside계 항생제 내성특성: Aminoglycoside계 항생제인 kanamycin, neomycin, streptomycin, paromomycin에서는 대부분의 균주가 100 µg/mL 이상의 농도에서도 생육하는 것으로 나타나 다른 항생제 보다 높은 내성 정도를 나타내었다. 이는 이미 발표된 다른 연구(15,16,18)와 유사한 결과로 이들 항생제에 대한 높은 MIC는 *Bifidobacterium*이 갖는 특징 중의 하나로 생각되며, 특히 kanamycin, neomycin의 경우에는 *Bifidobacterium*의 선택배

Table 1. Antibiotic resistance profiles of *Bifidobacterium* spp. isolated from human intestine for minimum inhibition concentration (%)

Antibiotics	Minimum inhibitory concentration (MIC, µg/mL)				
	1 ≥ MIC	10 ≥ MIC > 1	100 ≥ MIC > 10	100 < MIC	
β-Lactam	Penicillin G	65 ¹⁾	15	6	14
	Ampicillin	55	27	18	0
	Amoxicillin	58	41	1	0
	Cephalothin	13	69	18	0
Aminoglycoside	Kanamycin	0	2	0	98
	Neomycin	1	1	9	89
	Streptomycin	1	4	8	87
	Paromomycin	1	0	3	96
Gram-positive spectrum	Erythromycin	55	25	12	9
	Vancomycin	58	5	2	34
Gram-negative spectrum	Nalidixic acid	8	15	6	71
	Rifampicin	78	15	5	1
Broad spectrum	Chloramphenicol	28	72	0	0
	Tetracycline	16	19	53	12

¹⁾Percentage of the resistant strains to 103 *Bifidobacterium* spp. isolated from human at the concentration of antibiotics.

Table 2. Antibiotic resistance profiles of *Bifidobacterium* spp. isolated from commercial yoghurt for minimum inhibition concentration (%)

Antibiotics	Minimum inhibitory concentration (MIC, µg/mL)				
	1 ≥ MIC	10 ≥ MIC > 1	100 ≥ MIC > 10	100 < MIC	
β-Lactam	Penicillin G	0 ¹⁾	100	0	0
	Ampicillin	40	60	0	0
	Amoxicillin	10	90	0	0
	Cephalothin	0	100	0	0
Aminoglycoside	Kanamycin	0	0	0	100
	Neomycin	0	0	0	100
	Streptomycin	0	0	0	100
	Paromomycin	0	0	0	100
Gram-positive spectrum	Erythromycin	20	80	0	0
	Vancomycin	80	0	0	20
Gram-negative spectrum	Nalidixic acid	0	0	0	100
	Rifampicin	0	100	0	0
Broad spectrum	Chloramphenicol	0	100	0	0
	Tetracycline	0	0	90	10

¹⁾Percentage of the resistant strains to 10 *Bifidobacterium* spp. isolated from commercial yoghurt.

지에 첨가되는 선택약제중의 하나이다. 그러나 kanamycin과 neomycin은 100 µg/mL 이하에서 2-11% 균주가 저해를 보여 주고 있다. 그러나 Gram(-) 항생제인 nalidixic acid는 29% 정도가 100 µg/mL 이하의 저해농도를 보여주어 선택배지에 첨가되는 보충제로는 불완전한 것과는 대비된다. 이러한 결과는 이들 항생제가 *Bifidobacterium*을 부분적으로 저해한다는 Christian Hansen's Lab(personal communication)의 연구 결과와 유사하다.

Gram specific antibiotics 내성특성: Gram(+)*균*의 항생물질인 erythromycin의 경우 50% 이상 균주의 MIC가 1 µg/mL 이하인 것으로 나타났고 1 µg/mL보다 크고 10 µg/mL 이하 균이 25%이며 10 µg/mL보다 크고 100 µg/mL 이하인 균주 개수가 12%였다. Vancomycin의 경우는 전반적으로 1 µg/mL 이하의 균이 대부분이었지만, 100 µg/mL 이상인 균이 34%로 나타났는데 가장 강력한 항생제라 불리는 vancomycin에 높은 내성을 갖는 균이 많은 것으로 나타났다. 이는 발표된 다른 연구들과 비교했을 때 차이를 보여주고 것으로, *Streptococci*, *Corynebacteria*, *Clostridia*, *Listeria*, *Bacillus* species와 같은 Garm(+)*균*은 보통 0.5-3.0 µg/mL의 농도에서 저해되며, β-lactamase를 생산하는 *Streptococci*와 methicillin에 내성을 갖는 미생물들은 10 µg/mL의 농도에서 저해되는 것으로 알려져 있다. 최근에는 vancomycin에 내성을 갖는 vancomycin-resistant *Enterococcus*와 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)의 출현으로 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 따라서 이와같은 100 µg/mL 이상의 농도에서 증식하는 *Bifidobacterium*의 출현으로 접합(conjugation) 등에 의한 다른 병원성 미생물의 전이될 가능성에 대하여 보다 더 분자 생물학적인 연구가 필요할 것이라 사료된다.

Gram(-) 항생제인 nalidixic acid는 MIC가 100 µg/mL 이상인 균이 전체 균주의 71%를 차지하여 높은 내성률을 보였다. Rifampicin은 강력한 항균력을 갖고 있는데 균주의 대부분이 1 µg/mL 이하인 것으로 나타나 같은 계열의 nalidixic acid 보다는 낮은 항생제 내성율을 보여주고 있다.

Broad-spectrum antibiotics 내성특성: Broad-spectrum을 갖는

chloramphenicol은 1 µg/mL 이하의 균이 28%이고, 1 µg/mL 보다 크고 10 µg/mL 이하인 균이 72%로 대부분으로 비교적 낮은 내성 패턴을 보였다. Tetracycline은 1-100 µg/mL까지의 고른 분포를 보여주었으나 100 µg/mL 이상의 농도에서 증식하는 균주가 12% 검출되었다.

인체유래 분리균과 유산균 식품 분리균의 항생제 내성 비교

13종류의 유산균 식품에서 분리된 10종의 *Bifidobacterium*의 항생제 내성 특성은 Table 2에 나타나 있는데 penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cephalothin 4 종류의 β-lactams계 항생제 내성 패턴을 Table 1과 비교하였다. Penicillin의 경우 인체 장관 유래의 경우 MIC가 1 µg/mL 이하인 균이 65%를 차지하며 내성이 다양하게 분포하고 있으나 유산균 식품에서 분리한 균주 모두가 1 µg/mL 보다 크고 10 µg/mL 이하의 내성특성을 보여 주었다. Ampicillin, amoxicillin, cephalothin 등도 penicillin과 같이 인체분리 균주는 항생제 내성이 넓은 반면 유산균식품 분리 균주는 일정한 범위에서 주로 분포하고 있었다. Aminoglycoside계 항생제는 *Bifidobacterium*의 선택배지에 첨가되는 항생제로서 본래 이들 항생제에 대한 내성을 갖고 있다. 인체장관에서 분리한 균주나 유산균 음료의 경우, kanamycin, neomycin, streptomycin, paromomycin 이들 항생제에 대해 거의 대부분의 분리 균주가 MIC가 100 µg/mL 이상임을 확인할 수 있었다. Gram(+)*균*의 항생물질인 erythromycin과 vancomycin의 내성 비교는 erythromycin의 경우 1 µg/mL 이하의 MIC농도를 갖는 균이 인체장관 균의 경우 55%, 유산균식품 분리균의 경우 20%이며, 1 µg/mL 보다 크고 10 µg/mL 이하의 내성을 갖는 균은 인체장관이 25%, 유산균식품 분리균의 경우가 80%로 월등히 높았다. 그러나 인체장관 분리균주는 다양한 내성 분포를 보여 주었다.

Vancomycin의 경우는 두 그룹간의 두드러진 차이점은 발견되지 않았지만, 대략 20-30% 정도로 100 µg/mL 이상의 MIC 농도를 갖는 균이 검출되었다. Gram(-) 항생제인 nalidixic acid와 rifampicin 또한 두 그룹간의 큰 차이는 보이지 않았다. Broad-spectrum 항생제인 chloramphenicol의 경우 10 µg/mL 이하의 농도를 갖는 균이 인체 장관의 경우 72%, 유산균 음료균의 경우 100%

를 차지해 두 그룹간의 큰 차이는 보이지 않았다. Tetracycline은 100 µg/mL 이하의 농도에서 유산균 음료 균의 90%를 차지했고 인체장관 균의 경우 53%를 차지하였으며, 100 µg/mL 이상 농도에서는 두 그룹 모두 약 10%를 차지하였다.

따라서 인체 장관유래 균과 유산균 식품의 균주 모두 비슷한 항생제 내성 특성을 보여 주고 있는 것으로 나타났으며 vancomycin에 대한 내성이 강한 *Bifidobacterium*균들이 유산균 식품에 의 probiotics으로 활용되고 있는 것으로 보인다. 그러므로 현재 항생제 내성 세균의 출현으로 의학적으로 문제가 되고 있는 가운데 특히 최후의 치료 항생제로 알려진 vancomycin 내성이 높은 probiotics 균주에 대한 유해성 검토가 필요할 것으로 보인다.

요 약

장내 상주균이며 probiotics로 활용되고 있는 *Bifidobacterium*에 대한 항생제 내성분포를 분석하였다. 분석된 93개의 *Bifidobacterium*이 chloramphenicol, rifampicin, erythromycin에 대해서는 감수성을 갖고 있었고, aminoglycoside계 항생제, nalidixic acid와 vancomycin에 내성을 갖는 것으로 나타났다. 그리고 vancomycin의 MIC가 100 µg/mL 이상인 균이 전체 균주 중 34%를 차지했다. Tetracycline, erythromycin, penicillin에 대한 내성은 매우 다양하게 나타났다. β-lactam계 항생제인 penicillin G와 cephalothin은 10년보다 더 내성이 높아졌음을 알 수 있었고, ampicillin, amoxicillin, tetracycline은 항생제 농도가 점차 증가하고 있는 것으로 보인다. 인체유래 분리균과 유산균식품 분리균의 항생제 내성은 대부분 비슷한 특성을 보였으나 유산균식품 분리 균주중 vancomycin의 MIC가 100 µg/mL 이상인 균주가 약 20%가 되는 것으로 나타났다. 따라서 새로운 probiotics를 개발하기 위해서는 이러한 항생제 내성 특성을 분석하고 항생제 내성 위해성에 대한 검증이 필요한 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술개발사업(과제번호02-PJ1-PG1-CH08-0002)의 지원으로 이루어졌으며 이에 저자들은 사의를 표하고자 합니다.

문 헌

1. Modler HW, Mckllar RC, Yaguchi M. 1990. *Bifidobacteria* and bifidogenic factors. J. Inst. Sci. Technol. Aliment 23: 29-41

(1990)

2. Colombel JF, Cortor A, Neut C, Romond C. Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin induced gastrointestinal effect. Lancet 2: 43-48 (1987)

3. Mitsuoka T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora* 1: 3-5 (1982)

4. Clack PA, Martin JH. 1993. Selection of *Bifidobacteria* for use dietary adjuncts in cultured dairy food: II. Tolerance to simulated pH of human stomachs. Cult. Dairy Prod. J. 11: 11-14 (1993)

5. Adams MR, Marteau P. On the safety of lactic acid bacteria from food. Int. J. Food Microbiol. 27: 263-264 (1995)

6. Oakey HJ, Harty DWS, Knox KW. Enzyme production by lactobacilli and the potential link with endocarditis. J. Appl. Bacteriol. 78: 142-148 (1992)

7. Molin G, Jeppsson B, Johansson ML, Ahrne S, Nobaek S, Stahl M, Bengmark S. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. J. Appl. Bacteriol. 74: 314-323 (1993)

8. Wagner RD, Warner T, Roberts L, Farmer J, Balish E. Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria. Infect. Immunity. 65: 3345-3351 (1997)

9. Franz CMAP, Hozapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety Int. J. Food Microbiol. 47: 1-24 (1999)

10. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vara M, Valtonen V. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. Clin. Infect. Dis. 36: 775-780 (2003)

11. Tynkkynen S, Singh KV, Varmanen P. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (*van*) genes. Int. J. Food Microbiol. 41: 195-204 (1998)

12. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. Appl. Environ. Microbiol. 67: 561-568 (2001)

13. Kim YC, Jeong HK, Kim SH, Moon YI, Kim BC. The properties of *Bifidobacteria* isolated from Korean. Korean J. Dairy Sci. 20: 191-204 (1998)

14. Zarazaga M, Saenz Y, Portillo A, Tenorio C, Ruiz-Larrea F, Campo RD, Baquero F, Torres C. In vitro activities of ketolide HMR 3647, macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* isolates. Antimicro. Agent Chemo. 43: 3039-3041 (1999)

15. Lim KS, Huh CS, Back YJ. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. J. Dairy Sci. 76: 2168-2174 (1993)

16. Matteuzzi D, Crociani F, Brigidi P. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium*. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 134: 339-342 (1983)

17. Miller LG, Finegold SM. Antibacterial sensitivity of *Bifidobacterium* (*Lactobacillus bifidus*) J. Bacteriol. 93: 125-129 (1967)

18. Yazid AM, Shuhaimi M, Alivaani VK, Rokiah M, Reezal Y. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. Lett. Appl. Microbiol. 31: 57-62 (2000)