

구강 화농성 감염에서 혐기성 세균의 배양분리

장복실 · 이장희 · 최화석 · 최선진

(서울대학교 치과대학 미생물학교실)

Isolation of Anaerobic Bacteria from Oral Pyogenic Infections

Jang, Bok-Sil, Zang-Hee Lee, Wha-Suk Choi and Son-Jin Choe

Dept. of Microbiology, Dental College, Seoul National University

Strict anaerobic procedures and anaerobic chamber were employed in order to improve the isolation of obligate anaerobes from oral pyogenic infections. Also different culture media were utilized to maximize bacterial recovery. Two blood media: nalidixic acid Tween blood agar (NATB) and plain blood agar (BA), two non-blood media: nalidixic acid Tween agar (NAT) and Gifu anaerobic medium (GAM) were used and compared for their isolation efficacy.

Specimens from seven patients were collected with syringe. After collection, the needle was sealed with sterilized silicone rubber and brought to laboratory. The time spent from specimen collection to its processing in anaerobic chamber usually was 15 min. Identification of isolated bacterial strains was done with the API-20A system. Increase in isolation of anaerobic bacteria was achieved. Obligate anaerobic bacteria isolated were 3.3 strains per specimen. This figure falls within the range of 1.9-4.4 strains per specimen reported in other countries. With respect to the media utilized, blood media were superior to non-blood media. NATB medium was effective especially for the isolation of Gram-positive cocci. A total of 15 species of Gram-negative rods was isolated and 12 of them belonged to Bacteroides.

구강 상주세균의 한 성원을 이루는 혐기성세균은 구강감염을 일으킬 수 있다(최선진, 1981). 그리고 혐기성세균 감염의 대부분은 통성혐기성세균과의 혼합감염이다(Zavistoski *et al.*, 1980). 구강의 화농에서 농즙을 채취하고 처리하는 데는 어려움이 많다. 상당한 수의 상주세균이 있는 부위에서 검체를 채취할 때는 이 상주세균이 검체에 오염될 수 있다. 그리고 검체를 배지에 접종하거나 혐기적 환경에서 배양할 때 시간적으로 지연되면 혐기성세균의 생육에 영향을 주고 또 화농에 존재하는 세균종(細菌種)의 상대적 수를 정확하게 결정할 수 없다. 근래에 사용되는 방법은 세균의 분리, 증식 및 동정에서 어려움을 극소화 하도록 고안되고 있다. 검체가

상주세균으로 오염되지 않도록 하기 위하여 화농에서 농즙을 주사기로 채취하고, 산소에 민감한 혐기성세균의 사멸을 줄이기 위하여 또는 검체에 들어있는 세균종의 상대적 비율이 틀러지지 않도록 하기 위하여 검체를 가능한 한 빠르게 배양하고 또는 여러 배양배지의 사용 및 배양조건 개선 등은 그 예이다. 이와같이 혐기성세균의 배양기술과 방법이 개량되면서 임상 검체로부터 혐기성세균의 분리율이 높음이 보고되고 있다(Kannangara *et al.*, 1980 ; Aderhold *et al.*, 1981). 구강 화농성감염의 혐기성세균에 대한 국내의 연구는 부진하여 보고된 논문은 1편에 불과하다. 김성수(1982)가 행한 연구에서는 혐기적 방법을 일반적으로 따르기는 하였으

나 철저한 방법의 구사는 가능하지 못하였다. 혐기성세균의 배양에는 혈액첨가배지가 일반적으로 사용되고 있다. 그런데 우리나라의 작은 실험실에서 소규모로 혐기성세균을 취급할 때의 애로사항의 하나는 혈액의 확보이다. 외국과는 달리 전문적 혈액판매상이 아직 없고, 산 동물로부터 채취한 혈액의 공급은 여러가지 어려움이 있으므로 혈액이 첨가되지 않은 배지로서 혈액배지에서와 같이 좋은 생육이 가능한 배지를 발견할 수 있다면 그 어려움을 해결할 수 있을 것이다. 이와같은 관점에서 본 연구는 혈액배지인 날리딕산 혈액한천(NATB) 배지(Wren, 1980)와 혈액한천(BA)배지, 비혈액한천배지인 날리딕산 한천(NAT) 배지(Wren, 1978)와 G-AM(坂崎利一, 1982) 한천배지가 편성 혐기성세균의 배양과 분리에서 어떤 차이를 보이는지를 비교하였다. 그리고 철저한 혐기적 방법과 최신의 혐기적 배양장비의 사용이 상기한 여러 배지에서 편성 혐기성세균 분리에 미치는 영향을 아울러 검토하였다.

재료 및 방법

검체의 채취와 배양

서울대학교 병원 치과진료부 구강외과와 소아치과에 내원한 환자중, 농양으로 진단된 환자의 환부를 Merthiolate와 H₂O₂로 소독한 후, 18개이지 일회용 주사침과 주사기로 농즙을 채취하였다. 채취된 검체가 들은 주사침 끝은 실리콘 고무로 밀봉하여 실험실로 즉시 운반하였다. 혐기성세균의 배양을 위한 배지로는 아래에 기술하는 네 종류의 평판배지를 사용하였다. 이 배지는 혐기적 Chamber에서 12시간 동안 방치하여 미리 환원된 후 사용하였고, 검체의 접종에는 백금이(白金耳)를 사용하였다. 검체의 채취에서 접종까지는 보통 15분이 소요되었다. 혐기적 Chamber(Lab-Line Instruments Inc.)에는 표준혼합가스(한국표준연구소)를 CO₂ 5%, H₂ 10%, N₂ 85%의 비율로 사용하였고 이 혼합개스에 들어있는 잔여의 산소는 Deoxo purifier(Fisher Scientific Co.)로 제거하였다.

한편 검체의 일부는 슬라이드에 도말하여 그람 염색을 행하였고 세포의 그람 염색성, 형태,

크기 등을 관찰, 기록하였다. 배지에 두 백금이(약 0.2 ml) 만큼의 검체를 접종한 후, 48시간 또는 그 이상 배양하여 출현한 군락 개개의 형태, 크기, 색, 용혈성을 관찰, 기록한 후 순수배양을 위하여 대표적 군락을 선택하여 미리 환원된 혈액한천배지에 옮겨 2 차로 접종하여 48시간 동안 혐기적 배양을 하였다. 검체에 들어있는 통성 혐기성세균도 혐기적 환경에서 성장할 수 있는데(McBee 등, 1955), 이러한 세균을 검출하기 위하여 위의 2 차 증균배양 군락을 새 혈액한천배지에 이식한 후, 5%의 CO₂ 대기(candle jar)에서 24시간 배양하여 군락이 나타나면 이 세균은 통성 혐기성으로 판정하였고 동정검사에는 제외하였다. CO₂ 환경에서 성장하지 않아 편성 혐기성으로 판정된 세균만을 새로운 혈액한천배지에 배양하여 동정검사에 사용하였다.

배지의 제작

날리딕산 혈액한천(Nalidixic Acid-Tween Blood Agar, NATB) 배지는 Brain Heart Infusion Agar(Difco Lab.)에 Tween 80(0.1% (v/v))과 hemin(5 μ g/ml), menadione(0.5 μ g/ml)을 첨가하여 121 $^{\circ}$ C, 15lb/inch²에서 15분간 멸균하여 50 $^{\circ}$ C로 냉각시킨 후 oxalated human blood(5% (v/v))와 10 μ g/ml의 날리딕산을 첨가하여 만들었다(Wren, 1978). 혈액한천(Blood Agar, BA) 배지는 녹십자사의 제품을 구입하여 사용하였다. 날리딕산 한천(Nalidixic Acid-Tween Agar, NAT) 배지는 날리딕산 혈액한천배지의 처방에서 oxalated human blood만 제외하고 사용하였다. GAM 한천(Gifu Anaerobic Medium, GAM) 배지는 일본의 日水 제약주식회사의 GAM 한천배지 분말을 구입하여 日水지시서에 따라 만들었다.

분리세균의 동정

각 세균의 그람 염색 결과와 API-20A System (Analytab. Products, Inc)에 의한 검사결과로부터 분리세균을 동정하였다(Stargel 등, 1978).

결 과

편성 혐기성세균과 통성 혐기성세균의 분리 구강 화농성 감염 환자 7명의 검체로부터 편

Table 1. Recovery of obligate and facultative anaerobes

Media Organism Sample	NATB		BA		NAT		GAM	
	Obligate	Facultative	Obligate	Facultative	Obligate	Facultative	Obligate	Facultative
1	2	0	2	3	1	1	2	0
2	2	1	1	2	2	3	0	3
3	3	0	2	0	1	0	3	0
4	2	2	2	1	2	0	1	1
5	1	0	1	2	1	0	1	0
6	0	0	2	0	0	1	1	1
7	1	1	1	1	1	0	1	1
Total	11	4	11	9	8	5	8	5

성 혐기성세균은 NATB와 BA배지에서 각각 11주, NAT배지와 GAM배지에서 각각 8주씩 분리되었다. 통성 혐기성세균은 NATB 배지에서 4주, BA배지에서 9주, NAT배지와 GAM 배지에서 각각 5주씩 분리되었다(Table 1).

편성 혐기성 그람 음성균

분리된 혐기성 그람 음성균은 모두 16주로서 *Bacteroides*가 12주, *Veillonella*가 1주, *Fusobacterium*이 1주, 미동정 그람 음성간균이 2주였다(Table 2). 배지별로는 BA배지에서 8주, NATB배지에서 6주, GAM배지에서 5주, NAT배지에서 4주가 검출되었다. *Bacteroides*는 BA배지에서 7주 분리되었으나 NATB배지에서는 4주 분리되었고 모두 6종이 포함되어 있었다. BA배지에서는 NATB배지에서 분리되지 않은 *B. fragilis*와 *B. distasonis*가 각각 1주씩 분리되었다. 미동정 그람 음성간균은 GAM배지에서 검출되었다. GAM배지에서 분리된 *B. ovatus*와 *F. mortiferum*은 다른 세 배지에서는 분리되지 않았다. NAT배지에서 분리된 *B. distasonis*, *B. ruminicola*, *V. parvula*는 NATB에서는 분리되지 않았다.

편성 혐기성 그람 양성균

분리된 혐기성 그람 양성균은 모두 7주로서 *Peptococci*가 4주, *Actinomyces*가 2주, *Eubacterium*이 1주였다(Table 3). 배지별로는 NATB배지에서 5주, NAT배지에서 4주, BA배지와 GAM배지에서 각각 3주씩 검출되었다. NATB배지와 NAT배지에서 1주씩 분리된 *Eu-*

*bacterium*은 BA배지와 GAM배지에서는 분리되지 않았다. *Pc. prevotii*는 NATB배지에서만 1주 분리되었고 *A. israelii*는 GAM배지에서만 1주, *A. odontolyticus*는 NATB배지에서만 1주 분리되었다. NATB배지는 그람 음성균의 경우보다 그람 양성균의 경우에 분리효과가 컸다.

고찰

편성 혐기성세균은 유리 산소가 있으면 성장하지 못하는 생물체이다. 병소의 검체에서 이런

Table 2. Recovery of Gram-negative anaerobes

Organisms	Total number isolated	Number isolated on each medium			
		NATB	BA	NAT	GAM
<i>Bacteroides:</i>					
<i>B. melaninogenicus</i>	4	2	4	0	0
<i>B. oralis</i>	2	2	1	0	0
<i>B. fragilis</i>	1	0	1	0	0
<i>B. distasonis</i>	1	0	1	1	0
<i>B. ruminicola</i>	1	0	0	1	0
<i>B. ovatus</i>	1	0	0	0	1
<i>B. sps</i>	2	0	0	0	2
<i>Fusobacteria:</i>					
<i>F. mortiferum</i>	1	0	0	0	1
<i>Veillonella:</i>					
<i>V. parvula</i>	1	0	1	1	1
<i>unidentified</i>					
G(-) bacilli	2	2	0	1	0
Total	16	6	8	4	5

Table 3. Recovery of Gram-positive anaerobes

Organisms	Total number isolated	Number isolated on each medium			
		NATB	BA	NAT	GAM
<i>Peptococcus:</i>					
<i>Pc. asaccharolyticus</i>	1	1	1	1	1
<i>Pc. prevotii</i>	1	1	0	0	0
<i>Pc. sps.</i>	2	1	2	2	1
<i>Eubacterium:</i>					
<i>Eu. lentum</i>	1	1	0	1	0
<i>Actinomyces:</i>					
<i>A. israelii</i>	1	0	0	0	1
<i>A. odontolyticus</i>	1	1	0	0	0
Total	7	5	3	4	3

세균을 배양하려면, 채취에서부터 모든 취급 단계에 걸쳐 혐기적 방법으로 취급하여야 한다.

본 연구에서는 검체의 채취와 운반시 공기와의 노출을 최소화 하기 위해 주사기만을 채취에 사용하였고 이것으로 농즙을 흡입한 다음, 주사침을 실리콘 고무로 곧 밀봉하여 외부 공기와의 접촉을 차단하였다. 이 검체는 그 후 단시간(15분)에 연구실로 운반되어 혐기적 Chamber에 넣었다. 이는 혐기적 환경을 제공하는 최선의 기구로서 사용이 최근에 급증하고 있다. 이 기구는 Chamber속의 유리 산소의 양을 10 ppm 이하로 유지하므로 혐기성세균의 성장을 위한 최적의 환경을 제공한다. 배양에 사용하는 배지도 이 Chamber속에서 미리 환원되게 하여 배지의 Eh(산화환원전위)를 낮게 할 수 있었다. 산소의 농도가 낮다는 것은 즉, Eh가 낮다는 것과 유사하다. 엄격한 혐기성세균이라도 병소의 환경처럼 잘 환원한(낮은 Eh) 배지에 심어 산소가 없는 환경에서 배양하면 호기성세균에 못지않게 빠르게 자랄 수 있다. 물론 배지는 성장이 잘 되도록 모든 영양 요구를 포함하여야 한다. 국내의 병원에서 임상검체를 채취할 경우 대부분은 면전을 사용하고 이것을 Stuart운반배지(반유동배지)에 넣어서 운반한다. 이 운반배지는 어느 정도 환원된 것으로서 보면, 운반시 검체의 공기 노출을 억제하지만 몇가지 결점이 있다. 첫째 이 배지에서 통성 혐기성세균은 성장, 증식이 가능하여 수적으로 열세인 혐기성세균의

분리가 어려워진다(Isenberg 등, 1980). 둘째 면전에 채취된 검체의 세균 일부가 면전을 꺼낼 때 배지에 묻어서 상실될 수 있다(정운섭과 이삼열, 1983). 그러므로 운반배지의 사용없이, 본 연구에서처럼 주사기로 직접 농즙을 채취, 운반하는 것이 혐기성세균의 배양에 가장 적절하다(Isenberg 등, 1980). 또 국내병원에서는 배양기를 GasPak jar를 사용하므로 환원된 배지가 아닌 보통 배지에 접종하여 jar에 넣어 배양하는 경우가 많다. 비환원배지에 형성되어 존재하는 산화물질이 세균에 대하여 대단히 해로우므로 절저히 환원된 배지를 사용치 않고는 특정한 감염성세균의 배양이 불가능한 경우가 있다. 배양환경 다음으로 중요한 요소는 배양배지이다. 혐기성세균의 영양요구는 다른 세균에 비하여 까다롭기 때문에 요구되는 것들을 기초배지에 첨가하여야 한다. Vitamin K, hemine, yeast extract 또는 혈액의 첨가는 그 예이다. 임상검체로부터 혐기성세균의 1차적 분리배양에는 통상 혈액배지를 사용하는데, 서론에서 기술하였듯이 국내에서의 혈액확보가 쉽지 않으므로 비혈액배지를 준비하여 그 성능을 조사하게 되었다.

한편 혐기성세균은 단독 감염보다는 통성세균과 함께 혼합감염을 일으키는 경우가 더 많다. 혐기성세균만의 단독감염일 때는 그의 배양분리가 용이하지만, 다세균(Polymicrobial) 혼합감염일 때는 일반적으로 통성 혐기성세균의 성장이 빠르므로 상대적으로 느린 혐기성세균의 분리는 어렵게 되는 경우가 많다. 혐기성세균의 이런 단점을 제거하기 위하여 수종의 선택배지가 고안되어 사용되고 있다(Finegold, 1970; Sutter 등, 1980). 선택배지는 첨가한 특정 화합물의 세균성장 억제력에 의존하기도 하고(Dowell, 1964). 첨가한 항생제의 작용에 의한 것도 있다. 후자의 경우처럼 항생제가 첨가된 선택배지는 특징의 혐기성세균, 또는 특정 혐기성세균 속(genus)의 몇몇 종(species)의 성장을 억제하기도 한다(Wren, 1978). 그러므로 모든 혐기성세균의 성장을 얻을 수 있는 선택배지의 탐색은 계속되고 있고, 본 연구에서 채용한 NATB배지는 최근에 고안된 우수한 혐기성

세균의 배양을 위한 배지이다. 본 연구에서 사용한 4 개의 배지로 배양분리한 편성 혐기성세균은 모두 23주로서 검체당 평균 3.3주였다. 이는 외국에서 보고한 1.9주~4.4주(Adehold 등, 1981; Bartlett와 O'Keefe, 1979; Brook 등, 1981; Kannangara 등, 1980)의 범위에 속하는 것으로 우리의 높은 배양분리능을 보여주는 것이다. 한편 국내의 김성수(1982)는 구강의 화농성 감염 검체로부터 검체당 평균 0.8주의 편성 혐기성세균을 분리하였는데 이와 비교할 때 우리의 배양분리능력은 4 배나 높았다. 일반적으로 검체에서 통성 혐기성세균의 배양분리 빈도에 상응하는 빈도로 편성 혐기성세균을 분리치 못하는 절차와 방법은 혐기성세균을 취급하는데 적절하지 못하다(Holdeman 등, 1977). 편성 및 통성 혐기성세균의 배양분리에 관한 우리의 성적에서 비선택 BA배지와 보강배지 G-AM배지로부터 배양분리된 편성 혐기성세균은 통성세균을 수적으로 능가하였다. 이것은 이 연구에서 우리가 사용한 혐기적 절차와 방법이 우수함을 보여주는 것이다. NATB배지와 NAT배지에서 통성 혐기성세균이 적은 수로 분리된 것은 이들이 선택배지이기 때문이라 생각된다. 선택제인 날리딕산은 통성세균의 성장을 억제하며 그 효과는 NATB배지에서 보다 뚜렷하였다. 날리딕산과 Tween 80이 첨가된 NATB배지와 NAT배지에서 성장한 세균의 군락은 Wren(1978)의 보고처럼 다른 배지에 비하여 크게 형성되었

다. 군락이 크면 첫째 군락 형태의 관찰이 용이하고, 둘째 취급할 세균의 양이 증대한다. 혈액 첨가배지인 NATB배지와 BA배지에서는 그람 음성 혐기성세균이 비혈액배지인 NAT배지와 GAM배지에서 보다 많이 분리되었고, 그람 양성 세균의 분리에 있어서는 두 균의 배지사이엔 큰 차이가 없었다. 관찰된 이러한 차이의 유무에 의의가 있는지는 취급한 시료가 적기때문에 단언할 수는 없다. 앞으로 보다 많은 시료를 사용한 연구가 되더라도 좋을 것이다. 구강의 여러 화농성 감염에서 배양한 편성 혐기성세균 중, 그람 음성 간균의 분리범위는 30%~53%(Adehold 등, 1981; Bartlett와 O'Keefe, 1979; Brook 등, 1981; Kannangara 등, 1980)이다. 우리가 배양분리한 간균은 15주(65%)로서 다른 연구자의 것보다 높은 값이다. 우리의 수치가 높은 것이 어디에 기인하는지 지적하기는 어려우나, 취급하는 검체 또는 처리 방법의 차이에 연유하리라고 생각된다. 또한 우리의 검체수가 적은 때문일 수도 있을 것이다. 그람 음성 간균중에서 최대수를 차지한 균종은 *Bacteroides*로 모두 12주를 얻었다. 김성수(1982)는 그의 연구에서 그람 음성 간균으로서 *B. oralis* 1주를 분리하였는데, 이에 비하면 우리의 12주는 상당히 많은 것으로 이러한 사실은 본 연구에서 검체의 채취 및 운반에서는 물론 배양분리 절차에서도 철저히 혐기적으로 취급한 때문이라 생각된다.

적 요

절제한 혐기적 방법으로 배양분리한 결과 편성 혐기성세균의 분리율이 높아졌고, 검체당 평균 3.3주가 분리되었다. 혈액배지인 NATB배지와 BA배지에서 비혈액배지인 NAT배지와 GAM배지에서 보다 세균 분리효과가 우수했다. NATB배지에는 혐기성 그람 양성 구균에 좋은 분리효과를 나타내었고, 그람 음성 간균은 15주 분리되었다. 이 중 *Bacteroides*가 12주로서 가장 많이 존재하는 균종이었다.

감사의 말

검체의 채취에 도움을 주신 서울대학 병원 치과진료부 악안면구강외과의 여환호 선생과 소아치과의 이광기 선생에게 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. 김성수, 1982. 구강화농성 감염증에 관한 세균학적 연구. 대한치과의사협회지, 20, 37-48.
2. 정윤섭, 이삼열, 1983. 혐기성 세균의 검사법. 연대출판부.
3. 최선진, 1981. 치계성 감염의 미생물과 항미생물제. 대한치과의사협회지, 19, 835-837.
4. 坂崎利一, 1982. 細菌・真菌・原虫用培地,

日本매뉴얼. 東京.

5. Aderhold, L., H. Knothe and G. Frenkel, 1981. The bacteriology of dentogenous pyogenic infection. *Oral Surg.* 52, 583-587.
6. Bartlett, J.G. and P. O'Keefe, 1979. The bacteriology of perimandibular space infections. *J. Oral Surg.* 37, 407-109.
7. Brook, I., S. Grimm and R.B. Kielich, 1981. Bacteriology of acute periapical abscess in children. *J. Endodontics*, 7, 378-380.
8. Dowell, V.R., JR.E.O. Hill and W.A. Altemeier, 1964. Use of phenylethyl alcohol in media for isolation of anaerobic bacteria. *J. Bact.* 88, 1811-1813.
9. Finegold, S.M., 1970. Isolation of anaerobic bacteria. In *Manual of Clinical Microbiology*, Amer. Soc. Microbiol. 165-279.
10. Holdman, L.V., E.P. Cato and W.E.C. Moore, 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. Anaerobe Lab. V.P.I. and State University.
11. Isenberg, H.D., J.A. Washington II, A. Balows and A.C. Sonnenwirth, 1980. Collection, handling, and processing of specimens. In *Manual of Clinical Microbiology*, Amer. Soc. Microbiol. 52-81.
12. Kannangara, D.W., H. Thadepalli and J.L. McQuirter, 1980. Bacteriology and treatment of dental infections. *Oral Surg.* 50, 103-109.
13. McBee, B.H., C. Lamanna and O.B. Weeks 1955. Definition of bacterial oxygen relationships. *Bacterial. Rev.* 19, 45-47.
14. Stargel, M.D., G.L. Lombard and V.R. Dowell, Jr., 1978. Alternative procedures for identification of anaerobic bacteria. *Am. J. Med. Technol.* 44, 709-722.
15. Sutter, V.L., D.M. Citron and S.M. Finegold, 1980. *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*. 3rd ed. The C.V. Mosby Co., St. Louis, Mo.
16. Wren, M.W.D., 1978. A new selective medium for the isolation of non-sporing anaerobic bacteria from clinical specimens. *Medical laboratory Sciences*, 35, 371-378.
17. Wren, M.W.D., 1980. Multiple selective media for the isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens. *J. Clin. Pathol.* 33, 61-65.
18. Zavistoski, J., J. Dzink., A. Onderdonk and J. Bartlett, 1980. Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surg.* 49, 171-174.

(Received February 28, 1985)