

열기성 세균 배양을 위한 Steel Wool 법과 GasPak법의 비교

정 윤 섭

(연세대학교 의과대학 임상병리과)

Comparative Studies of Steel Wool Method and GasPak Method for the Culture of Anaerobic Bacteria

CHONG, Yun Sop

(Dept. of Clinical Pathology, College of Medicine, Yonsei University)

ABSTRACT

It is a well-known fact that an isolation of non-sporeforming anaerobes, considered normal flora in man ordinarily but causes serious infections sometimes, is a difficult procedure because of their great oxygen sensitivity. Among the many techniques employed in clinical laboratories, despite of its high expenses, the GasPak method has been most widely used because of its relative simplicity. On the other hand, the steel wool method has gained a good reputation recently. This technique makes it possible to treat individual plate so that any single specimen can be promptly cultured anaerobically. The procedure is quite simple and the expenses are negligible.

In the present study it is to compare these two methods as to their efficiency of anaerobic cultivation using 13 VPI strains of non-sporeforming anaerobic bacteria. Among the 13 species the following 11, *Bacteroides fragilis* ss. *fragilis*, *B. fragilis* ss. *thetaiotaomicron*, *Propionibacterium acnes*, *Eubacterium limosum*, *E. lentum*, *Peptococcus asaccharolyticus*, *Pc. prevotii*, *Pc. magnus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Ps. intermedius* and *Veillonella parvula*. grew well with the steel wool method whose colony numbers reaching 57 to 119% of those with GasPak method. The remaining two species, *Fusobacterium nucleatum* and *F. necrophorum*, did not grow well with the steel wool method showing the colony numbers were only 0.4% of those with GasPak method in the case of *Fusobacterium nucleatum*. In the case of *Fusobacterium necrophorum*, very few colonies developed even with a heavy inoculation.

As to the size of colonies, there were no significant differences between these two methods.

緒 論

인체에는 호기성 세균보다 더 많은 열기성 세균이 있으며, 이 열기성 세균이 때로는 여러가지 감염을 일으키기 오래전부터 알려져 있었으나, *Clostridium*에 의한 파상풍, 가스괴저, 보툴리즘 등을 제외한 non-

sporeforming anaerobic bacteria의 감염은 근년에야 많은 연구가 이루어지고 있다 (Kosakai 등, 1968; Sutter 등, 1972).

Non-sporeforming anaerobic bacteria는 pathogenicity는 낮지만 여러가지 감염을 일으킬 수 있으며 그 중에는 brain abscess, liver abscess, peritonitis, puerperal sep-

sis, tubo-ovarian abscess 등 중독한 감염이 있다(Tynes, 1962; 上野, 1967; Tillotson, 1968; Finegold, 1970; Sabbaj, 1972; Suzuki, 1972; Finegold, 1973). 이 세균들 중에는 항생제 감수성이 호기성 세균과는 전연 다른 것이 있으므로 그 분리, 동정 및 감수성 검사는 환자의 치료를 위해 절대로 필요한 것이다(Kislak, 1972; Sutter, 1972; 小栗, 1973).

염기성 세균감염이 근년에 특히 주목을 끌게 된 것은 이러한 감염이 드물거나 중요하지 않았기 때문이기 보다는, 손쉽고도 효과적인 염기성 배양방법이 없었기 때문이라고 할 수 있다(Suzuki, 1973).

염기성 배양방법에는 prerduced anaerobically sterilized (PRAS) tube method, anaerobic chamber method, anaerobic jar method 등이 있으나, clinical bacteriology laboratory에서는 anaerobic jar 법중 GasPak 법이 유효하고 간편하며, 안전하기 때문에 많이 이용되고 있다(Holdeman, 1973; 上野, 1973; Dowell, 1974). 그러나 GasPak 법은 값비싼 disposable envelope을 써야 하는 것이 결점이다.

上野(1964)는 Parker의 steel wool법을 써서 염기성 세균배양에 좋은 성적을 보고하였다. 이 방법은 재료가 구하기 쉽고, 값이 싸며, single plate 법은 plate 한개를 염기성으로 배양하게 되므로 임상검사물을 채취 즉시 처리할 수 있다.

연세의료원에서는 steel wool법과 GasPak법을 겸용하여 염기성 세균을 배양하고 있는데, 이 두가지 방법의 효과는 비교된 바 없으므로 저자는 steel wool의 single plate 법과 GasPak 법에 의한 배양결과를 세균수와 집락의 크기로서 비교하였다.

材料 및 方法

균주 : Non-sporeforming anaerobic bacteria 중 임상검사물에서 흔히 분리되는 species를 Dr. L. DS. Smith (Virginia Polytechnic Institute)에서 분양받았으며,

fluid thioglycollate broth (Difco)에 계대 배양한 young culture를 실험에 사용하였다.

배지 : Agar 1.7%를 첨가한 thioglycollate broth에 human bank blood를 5% 넣어서 만든 blood agar를 썼으며 표면의 수분을 2~3시간 건조시키고서 세균을 접종하였다.

희석액 : Kosakai(1968)의 phosphate buffer에서 agar 만을 제외한 것 (KH_2PO_4 4.5 g, Na_2HPO_4 6 g, sod. thioglycollate 0.3 g, D.W. 1,000 ml, pH 7.2)으로 세균배양액을 tenfold serial dilution 하고 각 희석액을 pipette을 써서 1/100 ml씩 두개의 plate에 접종하였다.

배양 : 한 plate는 steel wool의 single plate 법으로, 다른 한 plate는 GasPak 법으로 배양하였다. GasPak 법은 disposable GasPak envelope과, room temperature catalyst가 들어 있는 jar (BBL)를 지시된 방법에 따라 사용하였고, steel wool 법은 上野(1964)에 따르되 steel wool이 배지 표면에 닿지 않게 하기 위하여 petri dish의 뚜껑 대신에 밀착 안에 넣었다. Grade O인 steel wool 약 2g을 acid copper sulfate 용액(copper sulfate 5~10 g, Tween 80 2.5ml, 수도물 1,000 ml, sulfuric acid로 pH를 1.5~2.0으로 함) 100 ml에 30~60 초간 담가서 처리하여 넣고 CO_2 원으로서 NaHCO_3 포화액 소량이 들어 있는 작은 용기를 함께 넣었다(Watt, 1973). Petri dish는 vinyl 전기테프로 밀봉하였다. steel wool plate는 밀봉 후 30분간 실온에 놓아 두었다가 37°C 에 배양하였다.

배양성적은 3일간 배양후 판정하였다. Steel wool 법에 의해 생긴 집락수와 집락의 크기를 GasPak에 의한 것과 비교하였다. 집락수는 가능한 한 30~300개의 집락이 생긴 dilution을 택해서 세었다. 집락의 크기는 reticule을 넣은 현미경을 써서, 잘 isolation된 큰 집락들을 골라서 지름을 재어 평균치를 내었다. 세균에 따라 실험을 4회 이상 반복하였다.

結果 및 考察

Steel wool 법과 GasPak 법으로 3일간 배양하고 관찰된 집락 수와 집락의 크기는 표 1, 2, 및 3과 같다.

1. Gram-negative bacilli

Bacteroides: *B. fragilis* ss. *fragilis*의

steel wool 법에 의해 생긴 집락수는 GasPak에 의해 생긴 수의 30~122%(평균 62%) 이었다. 집락의 크기는 steel wool 법으로 1.0~1.4 mm(평균 1.2 mm), GasPak 법으로 1.0~1.7 mm(평균 1.4 mm)이었다.

B. fragilis ss. *thetaiotaomicron*은 steel wool 법으로 47~118%(평균 81%)의 집락이

Table 1. Efficiency of steel wool method of anaerobic culture compared to GasPak method by the number and size of colonies developed--*Bacteroides* and *Fusobacterium*

Anaerobic bacteria	No. of colony		Size of colony(mm)	
	GP *	SW	GP	SW
<i>Bacteroides fragilis</i> ss. <i>fragilis</i> , VPI 6859B	180	110(61%)	1.5	1.3
	125	59(47%)	1.3	1.1
	84	25(30%)	1.0	1.0
	255	127(50%)	1.6	1.4
	49	60(122%)	1.7	1.3
	Mean	(62%)	1.4	1.2
<i>Bacteroides fragilis</i> ss. <i>thetaiotaomicron</i> , VPI 6180A	33	27(82%)	0.4	0.4
	68	50(74%)	0.2	0.2
	360	170(47%)	0.2	0.3
	45	53(118%)	0.5	0.6
	131	108(82%)	0.4	0.7
Mean	(81%)	0.3	0.4	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> , VPI 4355	1,170	5(0.4%)	1.2	0.2
	5,600	3(0.05%)	1.2	1.2
	28,000	0	1.1	
	29,000	0	1.0	
	450	1(0.2%)	1.3	0.5
	1,400	13(0.9%)	1.4	1.3
	1,000	6(0.6%)	1.3	0.6
	2,100	7(0.3%)	1.2	1.3
	Mean	(0.4%)	1.2	0.9
<i>Fusobacterium necrophorum</i> , VPI 7761	270	0	1.6	
	330	0	1.5	
	285	0	1.8	
	34,000	0	2.5	
	22,000	0	2.0	
	1,200	0	2.0	
	1,500	0	2.0	
	1,700	0	1.8	
Mean		1.9		

* GP : GasPak, SW : steel wool.

생겼다. 집락의 크기는 steel wool로 0.2~0.7 mm(평균 0.4 mm)이었고, GasPak으로는 0.2~0.5 mm(평균 0.3 mm)이었다.

이 실험 결과는 steel wool 법이 *Bacteroides* 배양에 좋은 결과를 보일 수 있음을 나타내었다.

*Fusobacterium: Fusobacterium nucleatum*은 steel wool 법에 의해서 0.05~0.9% (평균 0.4%)의 집락이 생겼으나 2회의 실험에서는 GasPak 법으로는 각각 28,000 및 29,000의 집락이 생겼음에도 불구하고 steel wool 법에 의해서는 전혀 집락이 생기지 않았다. 집락의 크기는 steel wool 법으로 0.2~1.3 mm(평균 0.9 mm), GasPak에서는 1.0~1.4 mm(평균 1.2 mm)이었다. *Fusobacterium necrophorum*은 GasPak에 의해 270~34,000의 집락이 생긴 경우, steel wool에 의해서는 전혀 집락발생이 없었다. 단지 heavy inoculation을 했을 때만

극히 소수의 집락이 생겼다. GasPak 법에 의한 집락은 1.5~2.5 mm(평균 1.9 mm)이었다. 따라서 *Fusobacterium*을 배양하고자 할 때 steel wool의 single plate 법은 적당치 못하다고 하겠다.

上野(1964)에 의하면 steel wool의 jar법 및 single plate 법으로 *F. necrophorum*이 잘 배양되는 것으로 보고하여 본 실험결과와는 일치하지 않고 있다. *F. necrophorum*이 배양되기 어려운 것은 이 세균이 다른 세균보다 산소에 대해 민감하기 때문인 것으로 생각된다(Kosakai, 1968). 上野의 실험방법과 큰 차이는, 그는 7~10일간 배양하였으나 이 실험에서는 3일간 배양한 점이다. 혐기성 배양의 경우, 1주일 혹은 10일간의 배양이 필요한 것으로 되어 있으나, 환자검사물의 경우 48~72시간에 배양결과를 관찰하는 것이 보통이므로, 이 실험에서는 3일간 배양하고 결과를 비교하였다.

Table 4. Efficiency of steel wool method of anaerobic culture compared to GasPak method by the number and size of colonies developed—*Propionibacterium* and *Eubacterium*

Anaerobic bacteria	No. of colony		Size of colony(mm)	
	GP *	SW	GP	SW
<i>Propionibacterium acnes</i> I, VPI 0207	88	64(73%)	0.6	0.6
	146	86(59%)	0.5	0.8
	40	27(68%)	0.2	0.3
	260	200(77%)	0.6	0.9
	31	42(135%)	0.6	0.8
Mean		(82%)	0.5	0.7
<i>Eubacterium limosum</i> , VPI 0260	100	110(110%)	2.5	3.0
	48	38(79%)	2.0	1.3
	38	55(145%)	2.5	1.5
	59	83(141%)	2.0	2.5
Mean		(119%)	2.3	2.1
<i>Eubacterium lentum</i> , VPI 3345	100	130(130%)	0.2	0.2
	32	22(69%)	0.5	0.3
	42	24(57%)	0.4	0.5
	55	39(71%)	0.5	0.3
Mean		(82%)	0.4	0.3

* GP : GasPak, SW : steel wool.

2. Gram-positive bacilli

Propionibacterium acnes I: Steel wool 법으로는 59~135%(평균 82%)의 집락이 생겼다. 집락의 크기는 steel wool 법으로 0.3~0.9 mm(평균 0.7 mm)이었고 GasPak 법으로 0.2~0.6 mm(평균 0.5 mm)이었다.

Eubacterium: *E. limosum*은 steel wool 법으로 79~145%(평균 119%)의 집락이 생겼다. 집락 크기는 steel wool로 1.3~3.0 mm(평균 2.1 mm)이었고 GasPak으로 2.0~2.5 mm(평균 2.3 mm)이었다. *E. lentum*은 steel wool로 57~130%(평균 82%)의 집락이 생겼고 집락크기는 0.2~0.5 mm(평균 0.3 mm)이었다. GasPak으로 0.2~0.5 mm(평균 0.4 mm)의 집락이 생겼다.

이 결과를 보면 Gram-positive bacilli인 *Propionibacterium*과 *Eubacterium*은 steel wool 법으로 잘 배양된다고 하겠다. 특히 *E. limosum*의 steel wool plate 평균 집락 수는 GasPak에서 보다 많았다.

3. Gram-positive cocci

Peptococcus: *Pc. asaccharolyticus*는 steel wool로 56~104%(평균 74%)의 집락이 생겼다. Steel wool법 집락의 크기는 0.5~1.0 mm(평균 0.8 mm)이었고, GasPak으로는 0.5~0.7 mm(평균 0.6 mm)이었다.

*Pc. prevotii*는 steel wool 법으로 60~76%(평균 69%)의 집락이 생겼고 집락크기는 0.2~0.5 mm(평균 0.3 mm)이었다. GasPak에 의한 집락의 크기는 0.3~0.5 mm(평균 0.4 mm)이었다. *Pc. magnus*는 steel wool로 52~120%(평균 82%)의 집락이 생겼고 집락크기는 0.6~0.8 mm(평균 0.7 mm)이었다. GasPak에 의한 집락의 크기는 0.4~0.6 mm(평균 0.5 mm)이었다.

Peptostreptococcus: *Ps. anaerobius*는 steel wool 법으로 28~119%(평균 61%)의

집락이 생겼고 집락의 크기는 0.2~0.4 mm(평균 0.2 mm)이었다. GasPak에 의한 집락 크기는 0.2~0.3 mm(평균 0.2 mm)이었다. *Ps. intermedius*는 steel wool 법으로 37~93%(평균 57%)의 집락이 생겼고, 집락의 크기는 0.3~0.6 mm(평균 0.5 mm)이었다. GasPak에 의한 집락의 크기는 0.5~0.8 mm(평균 0.7 mm)이었다.

Steel wool 법은 *Peptococcus* 및 *Peptostreptococcus* 배양에 GasPak 만큼 못하나 상당히 유효한 방법임을 나타내었다.

4. Gram-negative cocci

Veillonella parvula : Steel wool 법으로 23~118%(평균 70%)의 집락이 생겼고 집락의 크기는 0.5~0.7 mm(평균 0.6 mm)이었다. GasPak 법에 의한 집락의 크기는 0.5 mm(평균 0.5 mm)이었다. *Veillonella*는 steel wool 법으로 잘 배양될 수 있음을 나타내었다.

이 실험에서 집락의 크기는 鈴木(1969)의 경우보다 작았는데 이것을 사용배지의 차이에 기인된 듯하다. 집락이 작았지만 집락의 관찰이나 colony picking에 지장은 없을 정도였다.

집락의 크기에 대한 차이를 보면 steel wool에 의해 더 큰 것이 6, 더 작은 것이 6, 같은 것이 1 species이었으므로 그 결과는 비슷하다고 하겠다. steel wool과 GasPak을 비교함에 있어서 집락이 많이 생기는 것과 큰 집락이 생기는 것이 항상 일치하지는 않았다. 즉 *E. limosum*에서 보면 steel wool에서 더 많은 집락이 생겼으나 그 크기는 GasPak에서 더 컸다.

Steel wool 법의 불편은 집락이 퍼지거나 오염이 되기 쉬운 점이었다. 이것은 배지표면을 2~3시간 건조시키고 쓰거나 silica gel을 동봉하여 과량의 수분을 제거함으로써 다소 막을 수 있었다.

摘 要

Steel wool의 single plate 법과 GasPak에 의한 혐기성 세균 배양효과를 non-sporeforming anaerobic bacteria 13 species를 가지고 실험하여 다음 결과를 관찰하였다.

Table 3. Efficiency of steel wool method of anaerobic culture compared to GasPak method by the number and the size of colonies developed—*Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, and *Veillonella*.

Anaerobic bacteria	No. of colony		Size of colony(mm)	
	GP *	SW	GP	SW
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> , VPI 2608	204	120(59%)	0.5	0.5
	130	98(75%)	0.6	0.8
	171	95(56%)	0.5	0.6
	138	103(75%)	0.7	0.9
	75	78(104%)	0.7	1.0
Mean		(74%)	0.6	0.8
<i>Peptococcus prevotii</i> , VPI 7100	72	48(67%)	0.3	0.2
	38	28(74%)	0.5	0.5
	270	163(60%)	0.4	0.3
	290	220(76%)	0.4	0.3
Mean		(69%)	0.4	0.3
<i>Peptococcus magnus</i> , VPI 6217	100	120(120%)	0.4	0.7
	73	38(52%)	0.6	0.8
	270	275(101%)	0.5	0.6
	260	190(73%)	0.5	0.8
	290	190(66%)	0.5	0.8
Mean		(82%)	0.5	0.7
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , VPI 6601B	80	21(26%)	0.2	0.2
	170	60(35%)	0.2	0.2
	125	120(96%)	0.2	0.2
	68	81(119%)	0.2	0.4
	105	29(28%)	0.3	0.2
Mean		(61%)	0.2	0.2
<i>Peptostreptococcus intermedius</i> , VPI 5939A	30	28(93%)	0.7	0.5
	90	35(39%)	0.8	0.6
	114	42(37%)	0.5	0.5
	116	68(59%)	0.7	0.3
	40	22(55%)	0.7	0.3
Mean		(57%)	0.7	0.5
<i>Veillonella parvula</i> , VPI 5788-1	41	25(61%)	0.5	0.6
	102	52(51%)	0.5	0.6
	145	34(23%)	0.5	0.5
	128	124(97%)	0.5	0.7
	98	116(118%)	0.5	0.7
Mean		(70%)	0.5	0.6

* GP: GasPak, SW: steel wool

1) *B. fragilis* ss. *fragilis*, *B. fragilis* ss. *thetaiotaomicron*, *Propionibacterium acnes* I, *E. limosum*, *E. lentum*, *Pc. asaccharolyticus*, *Pc. prevotii*, *Pc. magnus*, *Ps. anaerobius*, *Ps. intermedius*, *V. parvula*의 steel wool 법에 의해서 생긴 집락수는 GasPak 법에 의한 집락수의 57~119%이었다.

2) *F. nucleatum*은 steel wool 법에 의해 0.4%의 집락밖에 생기지 않았고, *F. necrophorum*은 heavy inoculation을 해야만 극히 소수의 집락이 생겼다. 따라서 steel wool의 single plate 법은 *Fusobacterium* 분리에 적당치 못하다고 하겠다.

3) 집락의 크기는 두 방법 사이에 큰 차이를 볼 수 없었고 steel wool 법으로 3일간 배양 후에 집락을 관찰하거나 subculture 하기에 지장이 없을 정도의 크기였다.

4) *Fusobacterium* 이외의 non-sporeforming anaerobe의 배양을 위해 steel wool의 single plate 법은 상당히 효과적이며 동시에 경제적이고 안전하며 손쉬운 방법으로 생각된다.

引用 文 獻

1. Dowell, Jr., V.R., 1974. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. CDC laboratory manual. USDHEW, Atlanta.
2. Finegold, S.M., 1970. Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Bethesda, pp. 265-279.
3. Finegold, S.M., 1973. Present status of knowledge concerning anaerobic infections and clinical anaerobic bacteriology in the United States of America. Speech delivered at the seminar on the anaerobic infection in Japan, pp. 1-8.
4. Holdman, L.V., and Moore, W.E.C., 1973. Anaerobe laboratory manual, 2nd ed. VPI & SU, Blacksburg.
5. Kislak, J.W., 1972. The susceptibility of *Bacteroides fragilis* to 24 antibiotics. *J. of Inf. Dis.*, **125**, 295-299.
6. Kosakai, N., Suzuki, S., 1968. Anaerobes in clinical medicine. Igaku shoin, Tokyo.
7. Sabhaj, J., Sutter, V.L., and Finegold, S. M., 1972. Anaerobic pyogenic liver abscess. *Clin. Rev.*, **77**, 629-638.
8. Suzuki, S., 1972. Infections due to anaerobes. *Jap. J. Clin. Pathol.*, **20**, 447-452.
9. Suzuki, S., 1973. Recent progress in the isolation and the identification of anaerobes in clinical medicine. *Jap. J. Clin. Pathol.*, **21**, 109-114.
10. Sutter, V.L., et al., 1972. Anaerobic bacteriology manual. UCLA, Los Angeles.
11. Tillotson, J.R., and Lerner, A. M., 1963. *Bacteroides pneumoniae*. Characteristics of cases with empyema. *Ann. Intern. Med.*, **68**, 308-317.
12. Tynes, B.S., and Frommeyer, Jr., W.B., 1962. Cultural, clinical, & therapeutic features in a series of twenty-five patients. *Ann. Intern. Med.*, **56**, 12-26.
13. Watt, B., 1973. The influence of carbon dioxide on the growth of obligate and facultative anaerobes on solid media. *J. Med. Microbiol.*, **6**, 307-314.
14. 小栗豊子, et al., 1973. 嫌氣性菌の各種化學療法劑に對する感受性の推移の検討. 第3回嫌氣性菌感染症研究會講演記錄. p.48.
15. 鈴木祥一郎, 上野一惠, 1969. 嫌氣性菌. 醫學書院, 東京.
16. 上野一惠, 1964. 國産 steel wool による嫌氣性培養法の實際. *Media Circle*, **57**, 1-7.
17. 上野一惠, 鈴木祥一郎, 1967. 嫌氣性感染症について. *Media Circle*, **12**, 1-18.
18. 上野一惠, 1973. 臨床嫌氣性細菌學提要. 岐阜大學醫學部. 岐阜.