

## 항생제를 이용한 Bifidobacteria의 선택배지

이정준\* · 신명수 · 나석환 · 배형석 · 백영진  
한국 야쿠르트 유업(주) 연구소

### Selective Media Containing Antibiotics for Counting Bifidobacteria

Lee, Jeong-Jun\*, Myeong-Su Shin, Seog-Hwan Na,  
Hyoung-Suk Bae and Young-Jin Baek

Hankuk Yakult Institute, Euiwang-Si, Kyunggi-Do 437-020, Korea

**Abstract** — Selective agar media were constructed for the counting of bifidobacteria in dairy products containing bifidobacteria, lactobacilli and streptococci. This media containing antibiotics inhibited the growth of lactobacilli and streptococci at less than  $10^5$  cfu/ml, but had no influence on the recovery of bifidobacteria. In order to inhibit the growth of  $10^5$  cfu/ml of lactobacilli and streptococci, the addition of 1.0~2.0  $\mu$ g/ml of tetracycline in BL agar medium was needed. When 25  $\mu$ g/ml of neomycin and paromomycin were mixed with 1.0  $\mu$ g/ml of tetracycline in BL agar medium, it was able to inhibit the growth of  $10^6$  cfu/ml of lactobacilli and streptococci but had a little negative effect on the recovery of colonies of bifidobacteria. The results revealed that the BL agar medium containing 1.0  $\mu$ g/ml of tetracycline was suitable to count the cell number of bifidobacteria selectively in the presence of a 1 to  $10^5$ -fold excess of *L. casei*, *L. acidophilus* and *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

Bifidobacteria는 장내에서 우점종으로 존재하며(1) 장내균총의 균형 유지(2)와 병원성균에 대한 길항작용(1, 3) 등을 하는 것으로 알려지면서 이 균주를 이용한 유제품들이 증가되고 있다(1, 4).

일반적으로 bifidobacteria는 *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus casei* 등과 같은 다른 유산균들과 혼합되어 제품화되는 경우가 많으며(5-7), 이 경우 절대 혐기성균주인 bifidobacteria는 유통과정중에 사멸하여 다른 유산균들과  $10^1 \sim 10^3$  cfu/ml의 생균수 차이를 나타내기도 한다. 따라서 bifidobacteria와 다른 유산균이 혼합되어 있는 유제품에서 bifidobacteria의 생균수를 정확히 계수하기 위해서는, bifidobacteria의 성장에는 영향을 미치지 않으면서 다른 유산균들을  $10^5$  cfu/ml 이하의 cell 농도까지 성장억제시켜 bifidobacteria만을 선택적으로 계수할 수 있는 선택배지가 필요하게 되었다(7).

유제품으로부터 bifidobacteria의 선별 및 생균수 측정을 위한 선택배지로는 당(8)이나 bifidobacteria가

갖고 있는 효소를 이용한 배지(9)들이 소개되고 있으나 주로 항생제를 이용한 배지(7, 10-14)가 사용되고 있으며, 그 중에서 neomycin, paromomycin, nalidixic acid, lithium chloride를 혼합·사용한 NPNL 배지(13)가 가장 많이 사용되고 있다. 그러나 이 NPNL 배지는 다른 유산균들의 성장을 억제할 뿐 아니라 bifidobacteria의 성장도 억제하는 문제점이 있는 것으로 보고되고 있다(14).

따라서 본 연구는 bacterial ribosome의 30S subunit에 결합하여 aminoacyl-tRNA의 결합을 방해함으로써 단백질 합성을 방해하는 것으로 알려져 있는 tetracycline(16)과 항생제 중 bifidobacteria가 내성을 나타내는 neomycin과 paromomycin을 이용하여, bifidobacteria의 성장에는 전혀 영향이 없으면서 다른 유산균들을  $10^5$  cfu/ml 이하의 cell 농도에서 성장억제시키므로써, 유제품으로부터 bifidobacteria만을 선택적으로 계수할 수 있는 선택배지를 개발하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

**Key words:** Selective media, bifidobacteria, antibiotics

\*Corresponding author

본 연구에는 현재 상업용으로 이용되고 있는 균주들을 사용하였는데, bifidobacteria로는 *Bifidobacterium longum*(Marshall Products), *Bifidobacterium bifidum*(Chr. Hansen's Lab.)을 사용하였으며, 그외 유산균으로는 *Lactobacillus casei*(한국 야쿠르트 유업(주) 연구소), *Lactobacillus acidophilus*(Marshall Products), *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*(Chr. Hansen's Lab.)를 사용하였다.

#### 선택배지의 제조

모든 선택배지는 BL 배지(11)를 기본배지로 사용하였으며, 여기에 tetracycline, neomycin, paromomycin을 각각 선정된 적정농도로 첨가하여 사용하였다. Tetracycline은 50% ethanol(v/v)에 녹여 사용하였으며, NPNL은 Teraguchi 등(13)의 방법에 따라 제조하여 사용하였다.

#### Tetracycline의 농도에 따른 유산균들의 성장억제 비교

각각의 유산균들을 10단계 희석법에 의해  $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$ 까지 희석하여, 각 단계별로 1.0 ml씩 petri-dish에 dropping하고, 여기에 tetracycline의 해당 농도가 첨가된 BL 한천배지를 분주한 후, 37°C에서 48시간 동안 혐기배양하여 나타난 colony를 계수·비교하였다. 혐기배양은 光岡의 방법(17)에 따라 실시하였다.

#### 항생제에 의한 유산균들의 성장억제 측정

Neomycin, paromomycin에 의한 각 유산균들의 성장억제를 측정하기 위하여, 10 ml BL broth에 각각의 항생제를 6.25, 12.5, 25, 50 µg/ml씩 첨가하고, 각 유산균들을  $10^6$  cfu/ml의 농도로 접종하여 37°C에서 20시간 배양한 후 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 균주혼합비율에 따른 선택배지들의 bifidobacteria 계수능력 비교

Bifidobacteria와 다른 유산균이 여러 농도 차이를 가지고 혼합되어 있을 때, 각 선택배지를 이용하면 어느 농도 차이까지 bifidobacteria의 선택적 계수가 가능한지를 다음과 같은 방법으로 알아보았다.

Bifidobacteria와 다른 유산균들을 10단계 희석법에 의해  $10^{-1}$ ~ $10^{-7}$ 까지 희석하여, bifidobacteria는  $10^{-7}$  단계에서 0.5 ml씩, 다른 유산균들은 각 단계별로 0.5 ml씩 petri-dish에 dropping하고, 여기에 각각의 선택배지를 분주하여 37°C에서 48시간 동안 혐기배양한 후 나타난 colony를 계수·비교하였다.

## 결과 및 고찰

Tetracycline의 농도에 따른 유산균들의 성장억제 Bifidobacteria가 *L. casei*, *L. acidophilus*, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* 등의 다른 유산균과 혼합되어 있을 때, tetracycline을 사용하여 bifidobacteria만을 선택적으로 계수하기 위해서는 다른 유산균의 성장을 억제시키는 tetracycline의 농도를 선정해야 하며, 선정된 농도에서 bifidobacteria의 성장억제가 나타나는지도 알아보아야 한다.

유제품이 유통되는 동안에 bifidobacteria와 다른 유산균들의 생균수 차이가  $10^1$ ~ $10^3$  cfu/ml까지 나타나는 경우가 있으므로, 다른 유산균의 성장을  $10^6$  cfu/ml의 농도까지 완전히 억제시킬 수 있는 tetracycline의 농도와 각 농도에서 bifidobacteria의 성장억제 여부를 알아보았다.

Table 1에서 보는 바와 같이 *L. casei*는 tetracycline을 0.8 µg/ml의 농도로 BL 한천배지에 첨가하면  $10^3$  cfu/ml까지, 1.0 µg/ml의 농도에서는  $10^5$  cfu/ml까지, 1.5 µg/ml의 농도에서는  $10^6$  cfu/ml까지, 2.0 µg/ml의 농도에서는  $10^7$  cfu/ml까지 성장이 억제되는 것으로 나타났다.

*L. acidophilus*의 경우는 1.0 µg/ml 이상의 tetracycline 농도에서  $10^5$  cfu/ml 이상이 성장억제를 나타내 *L. casei*와 큰 차이가 없었으며, *S. salivarius* subsp. *thermophilus*의 경우는 tetracycline이 0.8 µg/ml의 농도로 BL 한천배지에 첨가되어도  $10^6$  cfu/ml까지 성장억제됨을 알 수 있었다.

그리고 tetracycline에 의한 bifidobacteria의 성장억제 정도를 알아본 결과(Table 1), *B. longum*과 *B. bifidum* 모두 tetracycline이 2.0 µg/ml 이하의 농도로 첨가될 때는 성장에 억제를 받지 않는 것으로 나타났다. 따라서 tetracycline을 BL 한천배지에 1.0~2.0 µg/ml의 농도로 첨가하여 bifidobacteria의 선택배지로 사용할 경우 bifidobacteria의 선택적 계수가 가능하리라 생각된다.

#### Neomycin과 paromomycin에 의한 유산균 성장 억제

Neomycin과 paromomycin은 mistranslation의 원인으로, bacterial ribosomes에 결합하여 단백질합성과 mRNA의 misreading에 다각적 효과를 나타낸다(16). Bifidobacteria는 다른 유산균들에 비해 neomycin과 paromomycin에 대한 내성이 큰 것으로 나타나, 이들을 bifidobacteria의 선택적 계수를 위한 항생제로 사용하여 왔다(13).

**Table 1. Effect of the growth inhibition of lactic acid bacteria according to the cell concentration on the BL agar plates containing various tetracycline concentration (cfu/ml)**

Strain	Medium ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentration of lactic acid bacteria per plate							
		$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$
<i>L.c</i> <sup>1)</sup>	BL	2±1	14±2	160±15	++ <sup>7)</sup>	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(0.8) <sup>6)</sup>	0	0	0	pp <sup>8)</sup>	pp	++	lawn	lawn
	BL+TC(1.0)	0	0	0	0	0	pp	++	lawn
	BL+TC(1.5)	0	0	0	0	0	0	pp	lawn
	BL+TC(2.0)	0	0	0	0	0	0	0	lawn
<i>L.a</i> <sup>2)</sup>	BL	2±1	14±2	132±15	++	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(0.8)	0	0	0	pp	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(1.0)	0	0	0	0	0	++	lawn	lawn
	BL+TC(1.5)	0	0	0	0	0	++	lawn	lawn
	BL+TC(2.0)	0	0	0	0	0	0	++	lawn
<i>S.t</i> <sup>3)</sup>	BL	6±1	90±13	784±9	++	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(0.8)	0	0	0	0	0	0	++	lawn
	BL+TC(1.0)	0	0	0	0	0	0	++	lawn
	BL+TC(1.5)	0	0	0	0	0	0	0	++
	BL+TC(2.0)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.l</i> <sup>4)</sup>	BL	4±1	54±5	539±13	++	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(0.8)	7±2	57±2	525±11	++	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(1.0)	5±1	51±1	537±6	++	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(1.5)	4±2	59±9	500±10	++	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(2.0)	6±3	57±6	540±12	++	++	++	lawn	lawn
<i>B.b</i> <sup>5)</sup>	BL	5±1	55±6	480±19	++	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(0.8)	5±1	49±2	462±19	++	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(1.0)	5±1	52±2	549±27	++	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(1.5)	5±1	43±4	477±11	++	++	++	lawn	lawn
	BL+TC(2.0)	4±2	52±7	456±3	++	++	++	lawn	lawn

<sup>1)</sup>*L.c* : *L. casei*, <sup>2)</sup>*L.a* : *L. acidophilus*, <sup>3)</sup>*S.t* : *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, <sup>4)</sup>*B.l* : *B. longum*, <sup>5)</sup>*B.b* : *B. bifidum*, <sup>6)</sup>TC(0.8) : 0.8  $\mu\text{g/ml}$  of tetracycline, <sup>7)</sup>++ : Too many colonies, <sup>8)</sup>pp : Pinpoint colonies(<0.05 mm).

Neomycin과 paromomycin에 의한 유산균의 성장 억제는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 두 항생제를 각각 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 BL broth에 첨가해 줄 경우 *L. casei*와 *L. acidophilus*의 성장억제가 뚜렷이 나타나는 것을 알 수 있었으며, *S. salivarius* subsp. *thermophilus*에 대해서는 50  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도가 되어야 성장억제 효과가 나타남을 알 수 있었다. 두 항생제의 경우 각각 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 *B. longum*에 대한 성장억제는 거의 나타나지 않았다. 따라서 이들을 각각 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 BL 한천배지에 첨가하면 bifidobacteria의 선택적 계수가 가능하리라 생각되었다. 이 농도는 Teraguchi 등(13)의 NPNL중 neomycin과 paromomycin의 농도인 100  $\mu\text{g/ml}$ 와 200  $\mu\text{g/ml}$ 에 비해 매우 적은 양이다.

Neomycin과 paromomycin을 각각 선정된 농도(25  $\mu\text{g/ml}$ )로 BL 한천배지에 첨가하여, 이것을 선택배지로 사용할 때 plate 상에 나타난 colony 수를 비교하여 다른 유산균의 성장억제 여부를 확인하였다 (Table 2). Neomycin과 paromomycin만을 BL 한천배지에 첨가하여 선택배지로 사용한 경우, 흡광도를 통해 나타난 결과와는 다르게 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*뿐 아니라 *L. casei*와 *L. acidophilus*의 성장도 억제시키지 못하는 것으로 나타났다. 그러나 neomycin과 paromomycin을 1.0  $\mu\text{g/ml}$ 의 tetracycline과 함께 혼합하여 BL 한천배지에 첨가한 경우는 3 균주 모두  $10^6$  cfu/ml까지 성장을 억제시킬 수 있었으며, 2.0  $\mu\text{g/ml}$ 의 tetracycline과 혼합하였을 때는 3 균주 모두  $10^7$  cfu/ml까지 성장이 억제됨을 알 수

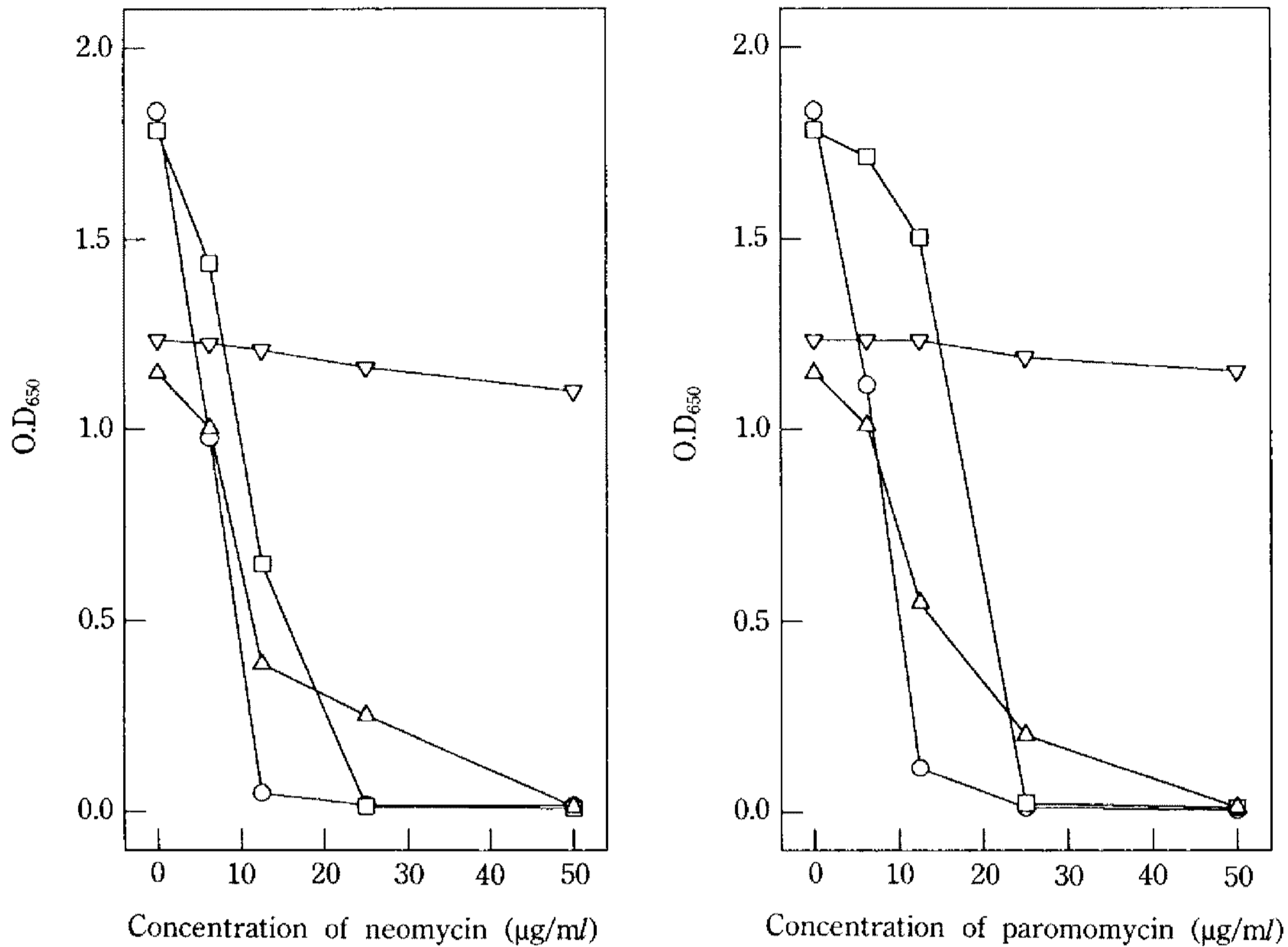


Fig. 1. Inhibition of the growth of lactic acid bacteria by antibiotics.  
 -○- *L. casei*, -□- *L. acidophilus*, -△- *S. thermophilus*, -▽- *B. longum*

있었다. 그리고 이 두 경우에 대한 bifidobacteria의 성장억제를 확인해 본 결과(Table 2), *B. longum*의 경우는 tetracycline의 첨가량에 큰 영향이 없는 것으로 나타났으며, *B. bifidum*은 colony의 수가 적게 나타나 성장이 약간 억제되는 결과를 보였다.

#### 균주혼합비율에 따른 선택배지들의 bifidobacteria 계수능력

Bifidobacteria가 다른 유산균과 여러 농도 차이를 가지고 혼합되어 있을 때, 각각의 선택배지를 이용하면 어느 농도 차이까지 bifidobacteria의 선택적 계수가 가능한가를 알아보았다.

*B. longum*과 *L. casei*가 여러 농도 차이로 혼합되어 있는 경우(Table 3), tetracycline을 1.0 µg/ml의 농도로 첨가한 선택배지(BL+TC)를 사용하면 *L. casei*가 *B. longum*에 비해 1~10,000배의 농도차이( $1:10^4$ )로 혼합된 경우에도 bifidobacteria의 선택적 계수가 가능하였다. 두 균주의 혼합비가  $1:10^5$  이상이 되면 *L. casei*의 것으로 보이는 pinpoint colony가 함께 나타났으나, bifidobacteria의 colony와는 현격한 크기 차이를 보여 bifidobacteria의 선택적 계수에는 문제가 없었다. Tetracycline에 neomycin과 paromomycin을

첨가한 선택배지(BL+TNP)는, *B. longum*과 *L. casei*가  $1:10^6$ 으로 큰 차이를 보일 때에도 bifidobacteria의 colony만이 형성되어 bifidobacteria의 선택적 계수가 가능하였다. 그러나 이 경우 bifidobacteria 수는 대조군(BL 1:0)의 약 80%만이 계수되어 bifidobacteria도 약간의 성장억제가 있음을 알 수 있었다. 그리고 BL+NPNL 배지에서는 bifidobacteria의 colony 수가 다른 선택배지에 비해 작게 나타났으며, *B. longum*과 *L. casei*가  $1:10^4$  이상의 혼합비 차이를 나타낼 경우 *L. casei*의 것으로 보이는 pinpoint colony가 함께 나타났고,  $1:10^5$  이상의 혼합비 차이에서는 두 균주의 colony 구별이 불가능하였다.

Bifidobacteria와 *L. acidophilus*가 혼합되어 있는 경우(Table 4)에는, BL+TC 배지에서 *B. longum*과 *L. acidophilus*가  $1:10^3$ 과  $1:10^4$ 으로 혼합되었을 때, *L. acidophilus*의 것으로 보이는 pinpoint colony가 함께 나타났으나 colony의 크기 차이에 의해 bifidobacteria의 선택적 계수가 가능하였다. 그러나  $1:10^6$ 의 혼합비에서는 lawn이 형성되어 bifidobacteria의 선택적 계수가 불가능하였다. BL+TNP 배지에서는  $1:10^6$ 의 혼합비에서 pinpoint colony가 함께 나타났으나 bifidobacteria의 선택적 계수에는 별 영향이

**Table 2. Effect of the growth inhibition of lactic acid bacteria according to the cell concentration on the BL agar plates containing various antibiotics (cfu/ml)**

Strain	Medium	Concentration of lactic acid bacteria per plate							
		10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
<i>L.c</i> <sup>1)</sup>	BL	2±1	14±2	160±15	++ <sup>9)</sup>	++	++	lawn	lawn
	BL+NP <sup>6)</sup>	2±2	4±2	67±17	++	++	++	++	lawn
	BL+T1NP <sup>7)</sup>	0	0	0	0	0	0	pp <sup>10)</sup>	pp
	BL+T2NP <sup>8)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L.a</i> <sup>2)</sup>	BL	10±2	134±2	++	++	++	++	lawn	lawn
	BL+N+P	7±3	93±7	156±13	++	++	++	lawn	lawn
	BL+T1NP	0	0	0	0	0	0	0	++
	BL+T2NP	0	0	0	0	0	0	0	++
<i>S.t</i> <sup>3)</sup>	BL	4±2	28±5	337±12	++	++	++	lawn	lawn
	BL+N+P	3±2	29±2	348±34	++	++	++	lawn	lawn
	BL+T1NP	0	0	0	0	0	0	0	++
	BL+T2NP	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.l</i> <sup>4)</sup>	BL	4±2	54±5	539±13	++	++	++	lawn	lawn
	BL+N+P	3±2	40±9	403±11	++	++	++	lawn	lawn
	BL+T1NP	4±1	51±7	525±16	++	++	++	lawn	lawn
	BL+T2NP	3±2	53±5	534±17	++	++	++	lawn	lawn
<i>B.b</i> <sup>5)</sup>	BL	5±1	55±6	480±19	++	++	++	lawn	lawn
	BL+N+P	3±1	36±5	295±10	++	++	++	lawn	lawn
	BL+T1NP	5±1	37±1	382±9	++	++	++	lawn	lawn
	BL+T2NP	4±1	34±5	318±21	++	++	++	lawn	lawn

<sup>1)</sup>*L.c* : *L. casei*, <sup>2)</sup>*L.a* : *L. acidophilus*, <sup>3)</sup>*S.t* : *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, <sup>4)</sup>*B.l* : *B. longum*, <sup>5)</sup>*B.b* : *B. bifidum*, <sup>6)</sup>NP : Neomycin(25 µg/ml)+Paromomycin(25 µg/ml), <sup>7)</sup>T1NP : Tetracycline(1 µg/ml)+Neomycin(25 µg/ml)+Paromomycin(25 µg/ml), <sup>8)</sup>T2NP : Tetracycline(2 µg/ml)+Neomycin(25 µg/ml)+Paromomycin(25 µg/ml), <sup>9)</sup>++ : Too many colonies, <sup>10)</sup>pp : Pinpoint colonies(<0.05 mm).

**Table 3. Comparison of colonies count of *B. longum* according to various mixed ratio of *L. casei* in several selective media (cfu/ml)**

Medium	Mixed ratio ( <i>B. longum</i> : <i>L. casei</i> )							
	1 : 0	1 : 1	1 : 10	1 : 10 <sup>2</sup>	1 : 10 <sup>3</sup>	1 : 10 <sup>4</sup>	1 : 10 <sup>5</sup>	1 : 10 <sup>6</sup>
BL	35±2	47±9	337±7	++ <sup>3)</sup>	++	++	lawn	lawn
BL+TC <sup>1)</sup>	37±4	36±2	34±1	30±2	23±2	33±1	37±2(pp)	39±1(pp)
BL+TNP <sup>2)</sup>	28±1	28±9	32±1	29±2	29±1	26±3	24±1	26±4
BL+NPNL	21±1	20±5	22±1	26±4	26±1	33±5(pp)	pp <sup>4)</sup>	pp

<sup>1)</sup>TC : 1.0 µg/ml of tetracycline, <sup>2)</sup>TNP : Tetracycline (1 µg/ml)+Neomycin (25 µg/ml)+Paromomycin (25 µg/ml), <sup>3)</sup>++ : Too many colonies, <sup>4)</sup>pp : Pinpoint colonies (<0.05 mm).

없었다. BL+NPNL 배지에서는 1 : 10<sup>6</sup>의 혼합비까지 pinpoint colony가 나타나지는 않았으나, bifidobacteria의 colony 형성율이 BL+TC나 BL+TNP 배지의 93%와 80%에 비해 70% 정도로 적게 나타나, BL+NPNL 배지에서 bifidobacteria의 성장이 가장 크게 억제받는 것으로 나타났다.

Bifidobacteria가 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*와 혼합되어 있는 경우(Table 5)는, BL+TC와 BL+TNP 배지에서는 1 : 10<sup>6</sup>의 혼합비 차이에서도 약 96%와 약 80%의 bifidobacteria colony 형성율을 보였으나, BL+NPNL 배지에서는 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*의 성장억제가 거의 일어나지 않아

**Table 4. Comparison of colonies count of *B. longum* according to various mixed ratio of *L. acidophilus* in several selective media (cfu/ml)**

Medium	Mixed ratio ( <i>B. longum</i> : <i>L. acidophilus</i> )							
	1 : 0	1 : 1	1 : 10	1 : 10 <sup>2</sup>	1 : 10 <sup>3</sup>	1 : 10 <sup>4</sup>	1 : 10 <sup>5</sup>	1 : 10 <sup>6</sup>
BL	35±2	31±3	95±9	++ <sup>3)</sup>	++	++	lawn	lawn
BL+TC <sup>1)</sup>	37±4	26±2	24±3	34±6	38±4(pp) <sup>4)</sup>	38±5(pp)	32±3(pp)	lawn
BL+TNP <sup>2)</sup>	28±1	34±2	25±1	27±4	25±1	29±4	31±3	27±2(pp)
BL+NPNL	21±1	22±5	30±1	28±4	19±3	27±5	25±2	21±1

<sup>1)</sup>TC : 1.0 µg/ml of tetracycline, <sup>2)</sup>TNP : Tetracycline (1 µg/ml)+Neomycin (25 µg/ml)+Paromomycin (25 µg/ml),  
<sup>3)</sup>++ : Too many colonies, <sup>4)</sup>pp : Pinpoint colonies (<0.05 mm).

**Table 5. Comparison of colonies count of *B. longum* according to various mixed ratio of *S. salivarius* subsp. *thermophilus* in several selective media (cfu/ml)**

Medium	Mixed ratio ( <i>B. longum</i> : <i>S. thermophilus</i> )							
	1 : 0	1 : 1	1 : 10	1 : 10 <sup>2</sup>	1 : 10 <sup>3</sup>	1 : 10 <sup>4</sup>	1 : 10 <sup>5</sup>	1 : 10 <sup>6</sup>
BL	35±2	31±1	42±8	140±9	++	++	lawn	lawn
BL+TC <sup>1)</sup>	37±4	33±4	35±2	33±6	34±1	34±2	27±3	37±9
BL+TNP <sup>2)</sup>	28±1	25±2	27±3	28±1	29±6	27±1	33±3	25±1
BL+NPNL	21±1	23±6	15±4	80±3	++	++	++	++

<sup>1)</sup>TC : 1.0 µg/ml of tetracycline, <sup>2)</sup>TNP : Tetracycline (1 µg/ml)+Neomycin (25 µg/ml)+Paromomycin (25 µg/ml),  
<sup>3)</sup>++ : Too many colonies.

bifidobacteria의 선택적 계수가 불가능하였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때, 1.0 µg/ml의 tetracycline을 첨가한 BL 한천배지를 bifidobacteria의 선택배지로 사용하면 *L. casei*, *L. acidophilus* 그리고 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*가 bifidobacteria와 1~10<sup>5</sup>배의 농도차이(1 : 10<sup>5</sup>)로 함께 혼합되어 있는 경우에도 bifidobacteria의 선택적 계수가 가능하리라 생각된다. 또한 1.0 µg/ml의 tetracycline이 첨가된 BL 한천배지에 neomycin과 paromomycin을 각각 25 µg/ml의 농도로 첨가하면, bifidobacteria가 다른 유산균들과 1~10<sup>6</sup>배의 농도차이(1 : 10<sup>6</sup>)로 혼합된 경우에도 bifidobacteria를 선택적으로 계수할 수 있으나, 약간의 bifidobacteria 성장억제를 감안해야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

Bifidobacteria가 lactobacilli, streptococci와 혼합되어 있는 유제품으로부터 bifidobacteria의 계수를 위해 bifidobacteria의 선택배지를 개발하였다. 항생제를 포함하는 이 선택배지는 bifidobacteria의 성장에는 영향이 없으면서 다른 유산균의 10<sup>5</sup> cfu/ml 이하의 농도를 성장억제시킬 수 있었다.

다른 유산균의 10<sup>5</sup> cfu/ml 농도를 성장억제시키기

위해서는 1.0~2.0 µg/ml의 tetracycline을 BL 한천배지에 첨가해야 하는 것으로 나타났다. Neomycin과 paromomycin을 각각 25 µg/ml의 농도로 1.0 µg/ml의 tetracycline과 혼합하여 BL 한천배지에 첨가할 경우에는, 다른 유산균의 10<sup>6</sup> cfu/ml 농도를 성장억제시킬 수 있었으나 bifidobacteria의 colony 형성율도 약간 감소하는 것으로 나타났다.

1.0 µg/ml의 tetracycline을 첨가한 BL 한천배지를 bifidobacteria의 선택배지로 사용하면 *L. casei*, *L. acidophilus* 그리고 *S. salivarius* subsp. *thermophilus*가 bifidobacteria에 비해 1~10<sup>5</sup>배 많은 농도 차이로 존재하는 경우에도 bifidobacteria의 선택적 계수가 가능하였다.

## 참고문헌

1. Rasic, J.L. and J.A. Kurmann. 1983. *Bifidobacteria and Their Role*. Birhauser Verlag, Basel, Switzerland.
2. Levesque, J. 1959. General aspects of the role of *L. bifidus* in infants. *Sem. Hop. Paris*. 35: 237-239.
3. Ruschmann, E. 1958. Studies on bacterial antagonism in the stools of healthy and ill infants with special reference to *L. bifidus* and pathogenic coli strains. *Z. Hyg. InfektKr.* 114: 298-306.

4. Hughes, D.B. and D.G. Hoover. 1991. Bifidobacteria; their potential for use in American dairy products. *Food Technol.* **45**: 74-80.
5. Kim, H.S. 1988. Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. *Cult. Dairy Prod. J.* **234**: 6-9.
6. Laroia, S. and J.H. Martin. 1991. Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Cult. Dairy Prod. J.* **26**: 13-21.
7. Samona, A. and R.K. Robinson. 1991. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *J. Soc. Dairy Technol.* **44**: 64-66.
8. Hirokazu, I., H. Masuda, T. Fujisawa, H. Suzuki, and T. Mitsuoka. 1993. Isolation and identification of *Bifidobacterium* sp. in commercial yogurts sold in Europe. *Bifidobacteria Microflora.* **12**: 39-45.
9. Chevalier, P., D. Roy, and L. Savoie. 1991. X- $\alpha$ -Gal based medium for simultaneous enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria in milk. *J. Microbiol. Methods.* **13**: 75-83.
10. Beerens, H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* sp. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**: 155-157.
11. Lapiere, L., P. Undeland, and L.J. Cox. 1992. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *J. Dairy Sci.* **75**: 1192-1196.
12. Sonoike, K., M. Mada, and M. Mutai. 1986. Selective agar medium for counting viable cells of bifidobacteria in fermented milk. *J. Food. Hyg. Soc. Jpn.* **27**: 238-244.
13. Teraguchi, S., M. Uehara, K. Ogasa, and T. Mitsuoka. 1978. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Jpn. J. Bacteriol.* **33**: 753-761.
14. Wijsman, M.R., J.L.P.M. Hereijgers, and J.M.F.H. de Goorote. 1989. Selective enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Neth. Milk Dairy J.* **43**: 395-405.
15. Rasic, J. 1983. The role of dairy foods containing bifidobacteria and acidophilus bacteria in nutrition and health. *North Eur. Dairy J.* **4**: 80-88.
16. Gale, E.F., E. Cundliffe, P.E. Reynolds, M.H. Richmond, and M.J. Waring. 1981. *The Molecular Basis of Antibiotic Action*. 2nd ed, John Wiley & Sons Ltd, London.
17. 光岡知足, 1980. 腸内菌の世界, 叢文社

(Received March 31, 1994)