

신생아 장내 미생물의 형성과 이의 분석을 위한 분자 생태학적 기술

박자령^{1,2} · 배진우¹ · 이성근³ · 남영도¹ · 오종원² · 박용하^{1,*}

¹한국생명공학연구원 생물자원센터, ²연세대학교 생명공학과, ³충북대학교 미생물학과

Development of Intestinal Microorganisms and Molecular Ecological Methods for Analysis of Intestinal Ecosystem in the Neonate. Park, Ja Ryeong^{1,2}, Jin-Woo Bae¹, Sung-Keun Rhee³, Young-Do Nam¹, Jong-Won Oh², and Yong-Ha Park^{1,*}. ¹Biological Resources Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-600, Korea, ²Department of Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, ³Department of Microbiology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea -Up to date, a number of review papers were reported on intestinal microorganisms that influence the health and disease of human being and diet that directly influence the establishment of intestinal microbial populations. Importance of studying intestinal microorganisms in the neonate arises from the easy approach to studying initial acquisition and settlement of intestinal microorganisms. Despite of the importance, few studies of neonatal intestinal microorganisms have been carried out and there is no paper focusing the factors to influence the development of intestinal microorganisms and molecular ecological methods for the analysis of intestinal ecosystem in the neonate. In this review, we summarized the status of our current knowledge of basic initial acquisition and settlement of intestinal microorganisms. And recent development of molecular ecological methods in studying the intestinal microbiology was also discussed.

Key words: Intestinal microorganism, molecular ecological methods, probiotics & prebiotics

미생물 서식처로서의 인간의 장

인간의 장(腸)은 복잡하고도 역동적인 생태계 중 하나로 [27], 10^{14} /g(분변) 의 미생물이 서로 공생 관계를 맺으며 살고 있다. 장내에는 박테리아들을 우 점으로 하여 Protists, Fungi 와 Archaea 등 다양한 미생물들이 존재하는데 성인의 1g의 분변 속의 박테리아 수가, 인간 전체의 tissue cell 의 수보다 10~20배 정도 많은 것으로 알려져 있다[46]. 장내 미생물은 '장(腸)'이라는 복잡한 'tube'에서 서식하기 때문에 이들에 대한 연구는 분변 시료뿐 아니라 위, 소장, 대장의 구획에 따라 이루어지고 있다. 각 구획에 따른 연구를 통해 특이하게 존재하는 미생물의 조성 and 인간의 건강에 대한 기여도를 알 수 있으며, 정착 미생물의 조성을 통해 장내 특정 지역의 성질을 거꾸로 유추할 수도 있다. 부위에 따른 미생물의 양을 보면, 위와 소장에서 10^3 bacteria/g or mL, 회장은 10^8 /g or mL, 그리고 대장에서는 10^{10} - 10^{12} bacteria/g or mL의 분포를 나타낸다[18]. 장의 부위별로 미생물의 밀도와 분포가 차이가 나는 이유는 각 부위의 pH와 혈류의 속도 등이 다르기 때문이다. 위와 소장에서는 낮은 pH와 빠른 혈류 속도 때문에 다른 부위에서보다 적은 수의 미생물이 존재하

며 비교적 산성에 강한 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*가 우 점종을 형성하고 있고, 소장의 끝부분인 회장은 윗부분보다 좀더 다양하고 풍부한 미생물을 포함하고 있다[24]. 대장은 혈류의 흐름이 가장 느린 신체 부분이기 때문에 다양한 미생물이 형성되는 최적의 장소이다[24]. 이렇게 다양한 미생물이 형성되는 데는 혈류속도나 pH 등의 장 내부의 요소들도 중요하지만, 많은 외부 요소들 또한 중요한 요인으로 작용한다. 이 중에서 어떠한 요소들이 장내 미생물 형성에 특히 크게 영향을 미치는지, 그리고 미생물 조성에 어떠한 변화를 주는지 알아보고자 한다.

신생아 장내 미생물의 기원

배속에서의 태아는 무균 상태이지만, 태어나는 과정이나, 주위 환경, 음식물의 차이에 따라 서로 각기 다른 장내 미생물을 형성해 나간다[12].

태어나는 방식에 따라

태어나는 방식의 차이는 장내 미생물 발달에 중요한 영향을 미친다[26]. 제왕절개 방법보다 자연 분만은 출산 과정의 시간이 길어 신생아의 입과 위에서 더 많은 미생물이 발견된다. 이와는 반대로, 제왕절개로 분만한 신생아의 장내에는 혐기성 미생물이 적고, 다양한 균종이 형성되기까진 더 많은 시간이 걸린다. 한 예로, 제왕절개 방법으로 태어난 초창

*Corresponding author

Tel: 82-42-860-4622, Fax: 82-42-860-4677

E-mail: yhpark@krribb.re.kr

기 아이들에게선 자연분만의 방법으로 태어난 신생아에게서 검출되지 않은 호기성 균주와, 통성 혐기성 균주가 우점을 나타낸다[7]. 제왕절개라는 방법상의 특징으로 아이가 태어나면서 공기와 접촉하는 면이 많아 혐기성 미생물이 쉽게 정착할 수 없기 때문에 호기성 미생물이 자라고, 그 후에 혐기성 미생물이 자라게 된다. 하지만 자연분만을 통해 태어난 아이들의 장에서 나타나는 미생물은 혐기성 미생물이 우점을 이루는데, 이렇게 분만의 방법 차이가 비록 단시간이지만 초창기에 형성되는 미생물은 큰 차이가 있음을 알 수 있다[7].

태어난 후의 주위 환경에 따라

태어나는 과정 이후에는 엄마로부터의 다양한 접촉이나, 주위 환경이 신생아 장내 미생물의 초기 형성을 돕는다. 신생아가 처음 획득하는 미생물은 주로 엄마에게서 많이 유래한다[43]. 초창기 신생아의 분변 시료에선 엄마의 질의 미생물 균총과 가장 유사한 형태를 보이고[7], 태어난 직후 신생아의 입과 엄마의 분변 샘플에선 같은 대장균의 serotype이 발견되며, 아기의 코, 인두의 미생물 집단의 62% 정도가 엄마의 질 속 미생물과 같은 종으로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다[23]. 특히, 신생아를 돌보는 환경은 아이의 초창기 장내 미생물을 형성하는데 큰 영향을 미치는데 위생 시설이 갖추어진 병원에서 태어난 아이들과는 다르게 개발도상국의 집안에서 태어난 아이에게선 주위 환경에 존재하는 미생물을 포함하는 경우가 많다[7]. 선진국에선 병원성 미생물의 전염을 막기 위해 출산과정에 있어 위생적인 환경을 유지한다. 하지만 이 같은 임신부와 신생아를 위한 위생 시설은 미생물의 정착을 조금 늦춰줄 뿐 완벽하게 무균 상태를 유지할 순 없다. 병원에서 조사한 기록에 의하면 말린 파우더, 수술용 기구, 그리고 부유시키기 위한 물 등에서도 미생물이 옮겨진다고 한다[24].

섭취하는 음식에 따라 (모유 VS 분유)

수 세기 동안의 많은 연구에 의해, 사람이 섭취하는 음식에 따라 배변 속 미생물의 구성원이 달라진다고 알려져 왔다[5, 8, 21, 37, 38, 50] 특히 신생아가 섭취하는 모유와 분유는 신생아 장내에 형성되는 초기 미생물을 결정지어 주는데, 이는 섭취하는 음식의 구성 성분 뿐 아니라(Table 1), 음식 내에 함유되어 있는 미생물의 조성에 따라 장내에 생성되는 미생물이 달라지기 때문이다[12]. 건강한 산모의 모유에는 *Bifidobacterium*을 우점으로 하여 *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* 등의 비병원성 박테리아 그룹이 소량 함유되어 있는 반면, 분유를 먹은 아이에게선 *Bacteroides*가 일정 기간 활발한 증식을 보인다. 분유와 모유를 섭취한 아이의 장내미생물은 시간이 지날수록 점차 뚜렷한 차이를 보이기 시작하는데(Table 2), 모유를 먹은 아이의 장에선 *Bifidobacterium*가 우점종으로 형성되고, 분유를 먹

Table 1. Comparison of ingredient from breast-feeding and bottle-feeding.

성분	breast-feeding	bottle -feeding
수분	88	88
칼로리(kal/dl)	70	70
단백질(g/dl)	1.1	3.2
지질(g/dl)	4.5	3.8
유당(g/dl)	7.1	4.7
회분(g/dl)	0.2	0.7
Whey:casein의 비율	60:40	20:80
락토페린(mg/dl)	27	
Lg A 면역글로블린	100	3
지방산(다포화:포화)	0.2:1	0.08:1
나트륨(mEq/L)	7	22
칼륨(mEq/L)	13	35
염소(mEq/L)	11	29
칼슘(mEq/L)	340	1170
인(mEq/L)	140	920
철(mEq/L)	0.5	0.5
아연(mEq/L)	1.2	3.9

Table 2. Comparison of fecal flora from breast-fed infants and bottle-fed infants (28~46 day of age)(according to[5]).

Organism	Breast-fed infants	Bottle -fed infants
	Number of specimens harbored	Number of specimens harbored
Bacteroide	19	23
Eubacteria	6	7
Peptococci	2	9
Bifidobacteria	35	33
Lecithinase positive clostridia	5	18
Clostridia-others	16	33
Veillonellae	15	21
Megasphaerae	3	
Lactobacilli	8	13
Enterobacteria	34	35
Streptococci	33	35
Micrococci	35	34
Pseudomonas	4	14
Corynebacteria	1	
Bacilli	3	15
Yeasts	4	5

은 아이의 장에선 *Bacteroides*와 *Clostridium*의 활발한 증식을 볼 수 있다. 모유의 *Bifidobacterium* 포함은 신생아 분변에서 검출되는 *Bifidobacterium* 의 절대적 공급원이다[34, 43]. 초기에 정착한 이들 모유 미생물은, 장내의 pH를 낮춰 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus* 속에 포함된 다양한 종을 더욱 증식 시키는데 최적의 조건을 형성한다. *Bifidobacterium* 은 십이지장 점막 표면에 *E. coli*, *Helicobacter jejuni*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp. 등의 병원

성 미생물이 정착하여, 병이 유발되는 것을 막아주고[9], 모유에 포함된 고농도의 lactose와 적은 양의 casein, calcium phosphate[7] 또한 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*와 같은 유용한 미생물의 증식을 도와, 미숙아나 병약한 신생아에게 종종 일어나는 전장염(enterocolitis)과 아토피를 방지한다[50]. 이러한 장점을 이유로 모유에 대한 중요성이 더욱 부각되었다.

Probiotics & prebiotics

인간과 공생하는 장내 미생물은 시간이 지남에 따라 항생제에 저항성을 보이기 시작하였다. 그러면서 고안된 것이 probiotics와 prebiotics이다. Probiotics는 숙주의 건강에 이로움을 줄 수 있는 생균제로, 사람이나 동물에게 살아 있는 미생물을 투여하여, 장내 균총의 개선을 돕고자 하는 물질이다[31]. Probiotics로 이용하고 있는 여러 종류의 미생물(Table 3)은 대부분 *Bifidobacterium* spp.와 *Lactobacillus* spp.로 요구르트와 같은 발효유에 널리 이용되고 있다[18]. *L. casei*는 오염된 Emmental cheese로부터 처음 분리되어, 우유의 발효와 풍미를 형성하기 위한 acid-producing-starter로 이용되고 있다. 현재 액상 요구르트의 제조 미생물로 가장 많이 사용되는 미생물로, 항암효과를 가지고 있으며, 소

장 점막에 IgA라는 면역성분을 증가시켜 면역력을 강화시킨다. *L. acidophilus*는 1900년 Moro가 신생아의 분변샘플에서 처음 분리한 이후, Metchnikoff에 의해 Bulgarian yoghurts에서 다시 한번 분리되었다. 이 미생물은 소장에 잘 정착하는 미생물로 혈중 콜레스테롤 감소와 면역강화 및 변비를 개선하는 기능이 있고, 담즙산과 산성에 뛰어나며, 항균물질을 생산하므로 유제품을 위한 산업용 probiotics로 가장 많이 사용된다. *L. reuteri*는 위, 소장, 대장, 질 등에 잘 정착하고, *L. acidophilus* 보다 내산성이 뛰어나며, 항균물질(reuterin)을 합성하여 거의 모든 유해세균을 강력히 억제한다. 설사에 개선효과가 뛰어나고 면역력을 강화하므로 유아용 probiotics에 유용하다. *Bifidobacterium longum*은 약 100년 전에 사람의 분변 샘플에서 분리되었고, 여러 가지 실험을 통해 인간의 건강에 유익한 미생물이라고 검증되었다[22]. 혈중 콜레스테롤의 농도를 낮추며, 항암 작용을 하고, 면역력을 증가시켜 주는 장점 때문에 *L. acidophilus*와 함께 probiotics로 널리 이용되고 있다(Data combined from combine Holzapfel et al.(1998) and Klaenhammer et al.(2002)).

Patrizia et al.[28]는 기능성 설사(functional diarrhea)나, 과민성대장증후군(irritable bowel syndrome)을 앓고 있는 환자 10명을 대상으로 *B. longum*, *L. casei*, *L. delbrueckii* sup. *bulgaricus*, *L. plantarum* 등이 혼합된 probiotics를 이용하여 실험하였다. 치료 전과 치료가 진행되는 20일 동안, 그리고 치료 10일 후의 상태를 분변 샘플을 통해 변화 양상을 관찰한 결과, probiotics를 투여하는 동안엔 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*의 미생물이 장내에서 수적으로 증가하면서 환자의 증상이 점차 좋아짐을 볼 수 있었다. 이로써 probiotics가 사람의 장에 발생한 특정 병에 대하여 치료의 목적으로도 사용할 수 있음을 증명하였다. 이것이 바로 새로 등장한 ‘bacteriotherapy’의 기본적 이론이다[34]. Bacteriotherapy의 또 다른 예로써, 구강을 통해 *Streptococcus aureus*를 이식하여 넣으면, 이 미생물에 의해 다른 유해한 미생물의 형성 작용이 현저히 떨어지는 것을 볼 수 있다[40]. 가끔 유산균 이외의 미생물을 probiotics로 사용하기 위한 연구도 진행되고 있는데, 병원의 환경으로부터 해로운 병원균을 획득한 신생아에게 이 미생물을 억제시키고자 probiotics를 응용하기도 하였다[42]. 기회 감염균과 같은 해로운 미생물을 구강 투여하여, 이미 획득된 병원균을 경쟁적으로 감소시킨다는 이론이다.

Probiotics와 같은 개념으로 이용되고 있는 또 다른 물질로 prebiotics를 들 수 있다. Probiotics가 특정 미생물을 직접 인체에 구강 투여하는 것이라면, prebiotics는 원하는 미생물이 장내에서 농화배양될 수 있도록 이들이 선호하는, 또 숙주인 인간이나 다른 장내 미생물에 비해 상대적으로 이용성이 높은 물질을 투여하는 것이다. 일반적으로 인간의 효소로는 소화할 수 없는 oligosaccharides를 투여하게 되

Table 3. Microorganisms applied in probiotic products(according to[18]).

Lactobacillus species	<i>L.acidophilus</i>
	<i>L.casei</i>
	<i>L.crispatus</i>
	<i>L.gallinarum</i> ^a
	<i>L.gasseri</i>
	<i>L.johnsonii</i>
	<i>L.plantarum</i>
	<i>L.reuteri</i>
Bifidobacterium species	<i>L.rhamnosus</i>
	<i>B.adolescentis</i>
	<i>B.animalis</i>
	<i>B.bifidum</i>
	<i>B.breve</i>
	<i>B.infantis</i>
	<i>B.lactis</i> ^b
<i>B.longum</i>	
Other LAB	<i>Ent.faecalis</i> ^a
	<i>Ent.faecium</i>
	<i>Lactoc.lactis</i> ^c
	<i>Leuc.mesenteroides</i> ^c
	<i>Ped.acidilactici</i> ^c
	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ^a
<i>Strep.thermophilus</i>	

^a mainly used for animals.
^b probably synonymous with *B. animalis*
^c little known about probiotic properties.

는데, 무너진 인체 장내 ecosystem을 정상적인 미생물 활동이 가능하도록 변화시키는 것이다. Hermie et al.[17]은 oligosaccharide중 하나인 inulin을 섭취하면 장내 유익균인 *Bifidobacterium*이 증가된다고 보고하였다. 유아에게서도 같은 실험 결과를 도출할 수 있었는데 Haarman et al.[14]은 분유를 섭취하는 아이들에게 galacto-oligosaccharides와 fructo-oligosaccharides를 prebiotics로 섭취시키면서 *Bifidobacterium* species의 증감현상을 real-time PCR을 통해 관찰하였다. 이 실험에서도 역시 Prebiotics를 섭취한 후의 신생아의 배변 샘플에선 섭취 전의 샘플에서보다 훨씬 많은 양의 *Bifidobacterium* species를 검출할 수 있었다.

그러나 이제까지 보고된 바에 따르면 probiotics와 prebiotics는 섭취 동안에만 효력을 보이고 섭취가 끝난 이후에는 다시 섭취 전의 상태로 돌아가는 현상을 볼 수 있다 [17, 28]. 이것은 투여하는 미생물의 장내 상피 세포에 부착하는 능력이 약하기 때문으로 보고 있다. 장내 접막에 *Lactobacillus* cell의 receptors가 부착하는 정확한 메커니즘이 아직 밝혀지지 않았지만, 특정 protein과 carbohydrate의 결합이 결정적인 역할을 하는 것으로 추정되고 있다[28]. 이런 메커니즘이 정확히 밝혀진다면, 무너진 장내 환경으로 인해 질병을 앓고 있는 사람들에게 일정 기간 동안만 probiotics를 투여하여 장기간의 치료효과를 기대하는 것도 가능할 것이다.

항생제(antibiotics)

항생제 치료 또한 미생물 군이 연속성에 큰 영향을 미친다[4]. 항생제를 투여하게 되면 장내 생태계가 매우 불안정해 지는데, 이것은 항생제가 미생물의 활성을 억제하기 때문이다. 항생제는 장내 환경의 모든 미생물을 억제하여 생태계를 파괴하는 것이 아니다. 일부 특별한 미생물 집단만을 억제하지만, 장내 생태계를 구성하는 미생물 간의 상호작용으로 인하여 다른 미생물의 활성과 구성에도 영향을 주고, 이로써 장내 미생물 간의 균형이 깨지면서 장내 환경이 무너지는 것이다.

이렇게 복잡하고도, 외부의 요인들에 의해서 쉽게 변화되는 장내 미생물 생태 환경을 알 수 있었던 것은 배양 방법에서 벗어나 새로운 분자 생태 기술의 도입으로 가능해 지고 있다. 장내 환경에서의 특정 미생물 혹은 다양한 미생물을 검출하거나, 모니터링 하기 위해 적용되는

Table 4. Media used for predominant bacteria in human intestine(according to[5]).

Medium	Main enumerated microorganisms
Aerobic incubation	
Trypticase soy(BBL) blood agar	<i>Predominant aerobes</i>
TATAC agar	<i>Streptococci</i>
DHL agar	<i>Enterobacteria</i>
PEES agar	<i>Staphylococci</i>
Potato dextrose agar	<i>Yeasts and molds</i>
NAC agar	<i>Pseudomonas</i>
Heat treatment	
Trypticase soy(BBL) blood agar	<i>Bacilli</i>
Anaerobic incubation	
EG agar	<i>Predominant anaerobes</i>
BL agar	<i>Predominant anaerobes</i>
NBGT agar	<i>Bacteroides</i>
BS agar	<i>Bifidobacteria</i>
ES agar	<i>Eubacteria</i>
VS agar	<i>Veillonella and megasphaera</i>
Neomycin-Nagler agar	<i>Lecithinase positive clostridia</i>
LBS agar	<i>Lactobacilli</i>
Heat treatment	
EG agar	
BL agar	<i>Clostridia</i>
Neomycin-Nagler agar	

몇 가지 새로운 기술의 특징과 적용 사례 등을 언급하고자 한다.

신생아 장내 미생물의 연구를 위한 새로운 분자 생태기술의 적용

배양법과 분자 생태 기술의 필요성

1980년대 후반까지 미생물의 다양성을 확인하는데 대부분의 미생물학자들은 선택배지(Table 4)를 이용한 배양 방법을 사용하여 왔다. 하지만 현미경에서 관찰 가능한 대부분의 미생물들을 이러한 접근 방법으로는 키워낼 수 없다는 한계를 알게 되었고(Table 5) (Great plate count anomaly:[2]), 이후 모든 미생물에 가장 보존이 잘 되어있는 16S rRNA gene을 환경에서 직접 PCR함으로써 미생물의 다양성을 연구하게 되었다[1]. 이러한 분자 생태학적 기술의 도입은 장내미생

Table 5. Groups of bacteria found in fecal of neonates(<1 wk of age) on the basis of results from conventional culture-dependent techniques(according to[24]).

Bacteria	Aerobes or facultative anaerobes	Anaerobe
	<i>Bacilli, Corynebacteria, Enterobacteria, Enterococci, Lactobacilli, Micrococci, Propionibacteria, Staphylococci, Streptococci</i>	<i>Bacteroides, Bifidobacteria, Clostridia, Eubacteria, Peptostreptococci, Ruminococci, Veillonella, Fusobacteria</i>
Range (log ₁₀ CFU)	8.2-9.1	7.8-9.3

물의 다양성을 연구하는 데에도 많이 적용되었다. 대표적인 기술로 FISH[15], DGGE[39] & TGGE[52], Quantitative PCR[3], T-RFLP[16, 36], 16S rRNA gene cloning[16, 51], plasmid profiling[43] 등을 들 수 있다(see Table 6). Primer binding site로서 대부분의 미생물의 rRNA 분자의 conserved regions을 이용하여 universal PCR primer를 제작하게 되었고[20, 47], 이것은 Archaea, Bacteria, Eucarya 등과 같은 다양한 분류 그룹 사이에서도 사용할 수 있다. 공통적인 부분을 이용하여 universal PCR primer 및 probe를 제작한 것과는 달리, 각 미생물 그룹에서만 보존된 부위를 이용하여 그룹 특이적 PCR primer 및 probe를 제작할 수도 있고, 이를 통해 특정 그룹의 미생물의 장내 분포도와 우점을 좀더 구체적으로 연구할 수 있게 되었다.

DGGE

1993년 Muyzer *et al.*[25]가 복잡한 환경으로부터 미생물의 다양성을 분석하기 위하여 DGGE기술을 접목시키면서, 환경 생태의 분자적 기술의 중요성이 부각되었다. 이 방법은 다양한 미생물의 16S rDNA를 PCR로 증폭시킨 후 polyacrylamide gels에 한꺼번에 로딩하여 패턴을 분석함으

로써 결과를 도출한다. 분석은 전기영동 시 gel 내에 존재하는 denaturants(urea와 formamide)의 농도구배에 따라 핵산의 이중나선 구조와 변성구조 즉, 염기서열이 가지는 Tm 값의 차이에 의해 핵산의 이동 속도가 달라 gel의 특정 위치에서 이동을 중단하면서 밴드를 형성하는 원리를 이용한 것이다. 미생물 집단의 구성에 관한 좀더 구체적인 연구를 위해 기존에 알려져 있는 장내 우점종을 대상으로 specific primer를 합성하여 DGGE를 수행하기도 한다. Christine *et al.*[11, 49]과 Hens *et al.*[16]은 장내 우점으로 존재하는 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus* 만을 검출하기 위해 specific primer를 디자인하여 각각의 신생아에게서 달리 나타나는 *Bifidobacterium* species의 집단과 연속성의 차이, *Lactobacillus* species의 다양성을 각각 발표했다. 장내 미생물의 다양성을 알고자 DGGE 방법을 이용할 때의 가장 큰 장점은 여러 명의 분변 샘플을 동시에 비교, 분석할 수 있고, 시간의 흐름에 따른 복잡한 미생물 집단의 관계를 간단히 모니터링 할 수 있다는 점이다. 그 예로 Christine *et al.*[12]이 연구한 결과를 보면, 대략 1년 동안 신생아의 분변 샘플을 이용하여 신생아가 섭취하는 음식에 따라, 시간의 경과에 따라 변화하는 *Bifidobacterium* 연속성과 다양성을 보

Table 6. Comparative table of molecular ecological methods for studying the intestinal microorganisms.

Methods	사용 목적과 장점	기술의 한계	정량성	속도	Coverage	경제성
Cultivation	미생물 분리 및 생리학적 연구 가능	많은 시간 및 노력 요구, 재현성 결여, 최적의 배양 조건 찾기 어려움	*	*	*	*****
16S rDNA PCR-cloning	특정 샘플에 대한 미생물 조성 분석에 가장 많이 이용됨. 미 배양 미생물에 대한 높은 coverage	PCR biases에 의한 반정량적 분석, 많은 시간 및 sequencing 비용	***	**	*****	**
DGGE/TGGE	16S rDNA PCR을 통한 집단 구성원의 변화 모니터링, 많은 수의 샘플을 동시 비교 가능	PCR biases에 의한 반 정량적 분석, 각 구성원 (band) 동정을 위해 sequencing 요구, 샘플 내 미량 존재 미생물은 검출 불가능	**	***	**	***
T-RFLP	16S rDNA PCR을 통한 집단 구성원의 빠른 동정과, 샘플간의 비교 분석	PCR biases, DGGE보다 낮은 resolution	***	****	**	****
FISH	특정 그룹 미생물에 대한 probe 제작 및 반응을 통해 실제 생태계에서 직접 미생물 검출하여 시각화 가능	제작된 probe의 specificity에 대한 낮은 정확성, 존재하는 미생물보다 적은 숫자가 관찰됨. gram-positive cell wall의 검출을 위한 최적의 조건 형성 미흡	****	***	****	**
Flow cytometry	일반적으로 FISH법과 함께 이용됨, 특정 종만을 검출 및 분리 가능, 미 배양 미생물의 계층 확보 가능	FISH와 같은 단점 존재, 일부 정확하지 못한 cytometry 발생	****	**	****	*
Q-PCR	특정 그룹 미생물에 대한 specific primer를 이용하여 정량적 PCR. 매우 민감하고 정량적인 분석 가능	Very low throughput: 각 primer에 대한 정량성 필요, 목표 미생물 종마다 다른 primer제작 요구, 별도의 실험 필요함	*****	**	****	**
Microarray	현재 최첨단 기술, High-throughput: 최고 10만개의 probe에 대한 한번의 반응으로 전체 생태계 분석 가능, 16S rDNA의 기능 유전자 분석 가능	비싼 비용, specific probe제작의 어려움, 생태계 적용 시 Q-PCR보다 떨어지는 민감도	****	*****	**	**

고하였다. 또한 부모의 분변 샘플과 그 자녀의 분변 샘플을 통하여 Bifidobacterial profiles를 비교함으로써 장내미생물이 유전이 되는지를 확인하는 실험도 진행되었다. 이 논문은 DGGE 기술이 음식과 항생제 복용, 환경적인 변화 등으로 인한 장내 미생물의 변화 양상을 모니터링하는 데 매우 유용한 기술이라고 설명하고 있다. 이렇게 미생물 집단의 분석이 용이한 장점이 있지만, 타 미생물 그룹에 비해 상대적으로 적은 양이 포함된 미생물 집단은 그만큼 증폭 산물이 적기 때문에 검출에 제한이 있을 수 있다. 또한, primer 합성 시 mismatch가 있어 검출에 오류가 있을 수 있으며, DNA증폭 과정 시 오류 발생, 불분명한 melting domains 때문에 sequencing의 결과가 정확하지 못하다는 단점도 동시에 존재 한다.

Quantification PCR

Quantification PCR(Q-PCR) 기술은 target 만을 특이적으로 증폭함으로써, 이 증폭량을 실시간으로 확인하는 기술이다. Q-PCR의 원리는 PCR 증폭 시 형광물질(Ethidium bromide, YO-PRO-1, SYBR green)을 같이 넣어 주어 증폭 시키면, target의 double strand DNA와 결합하여 강한 형광 빛을 발산한다. 여기서 나오는 형광강도를 검출하여 증폭 산물의 생성량을 실시간으로 측정할 수 있다. 특히 이 방법은 빠른 검출 속도와 형광인자를 이용한 민감한 검출 방법이며, 높은 감도로 증폭이 가능하며, 오염물을 줄일 수 있는 장점을 가진다. 샘플에 자신이 검출하고자 하는 target이 미량으로 존재하여 FISH나 일반 PCR로 하기 어려울 경우라도 Q-PCR 방법으로는 검출이 가능하다. 이런 빠르고 민감한 검출 방법은 기존의 배양이나 PCR방법으로 다루기 어려웠던 미생물 집단을 검출하기 위하여 사용되었다. Haarman *et al.*[14]은 태아에게 각각 모유, 분유, prebiotics(galactooligosaccharides + fructo-oligosaccharides), 그리고 placebo를 섭취하게 하여 *Bifidobacterium*의 변화 양상을 분변을 통해 실험하였다. *Bifidobacterium* spp.에 속한 species-specific primer를 제작하여 Q-PCR을 수행하면 소량의 변화를 보이는 종도 민감하게 검출이 가능하다. 하지만 이 기술 역시 단점이 있다. 매 PCR당 가장 적합한 standard를 만들어 비교해야 한다는 것이다. Standard는 target과 유사한 조건에서 PCR증폭이 일어나야 하며, 반응물의 양을 정확히 알고 있어야 비교가 가능하다. 그리고 target과 standard와의 적정한 비율 범위를 맞추기 위해 여러 농도를 실험해야 한다는 번거로움이 있다.

Fluorescence in situ hybridization(FISH)

Fluorescence *in situ* hybridization(FISH)은 target 이 되는 DNA와 RNA에 직접 형광물질(AMCE, Fluorescein-isothiocyanate(FITC), Tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate (TRITC), Cy3TM, Cy5TM)을 붙여 검출하는 방법이다. 기존

에 알려져 있는 sequence 정보를 토대로 15-23 nucleotides 정도 길이의 probe를 제작하고, 이 probe의 5'-end에 형광 표지인자를 붙여 target cell에 붙이면 형광현미경을 통해 육안으로 관찰이 가능하다. 이 방법은 인간의 장과 같이 복잡한 환경에서 특정 미생물 집단을 검출하기 위한 유용한 기술이며[30], 배양 기술에서 벗어나 환경에서 직접 single cell의 동정이 가능한 기술이다[13]. 이렇게 배양 방법에서 벗어나 환경에서 직접 target을 검출할 수 있다는 장점 때문에 probe를 제작하여 간편하게 미생물 검출에 이용할 수 있다. 이렇게 제작한 하나의 probe는 oligonucleotide 제작 시 mismatch의 오류와, 기존에 알려진 sequence정보의 부정확성으로 인해 정확한 target cell만을 검출하는 결과를 얻을 수 없음이 알려졌고, 다양한 probe 제작에 관한 연구가 시작되었다. Lay *et al.*[19]는 *Clostridium leptum* subgroup을 검출하기 위하여 species-specific probe를 여러 개를 제작하여 경쟁적으로 사용하였다. 이러한 접근 방식을 통해 하나의 probe를 사용하여 검출하는 것보다 훨씬 더 나은 probe의 정당성이 입증되었고, 월등한 특이성을 보여 주었다. Franks *et al.*[13]는 인간 장내에 우점을 형성하고 있다고 알려져 있는 미생물(*Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*)을 대상으로 6개의 genus-specific probe를 제작 하였다. 위와 같이 제작된 6개의 probe를 통해 장내에 형성되어 있는 각각의 미생물이 전체 환경에서 얼마나 우점하고 있는지 알 수 있었으며, 더 나아가 우점종의 변화에 따라 건강 상태를 체크하는데 응용할 수도 있고, 정상적인 장내 환경을 유지하기 위해 각 미생물들이 어떠한 역할을 하는지도 설명이 가능하여졌다. 하지만 우리가 알고 있는 장내 미생물의 정보는 극히 일부인데 반하여, 장내에 형성된 미생물은 너무나 다양하고, sequence가 유사한 미생물들이 많이 존재하기 때문에 species level로 probe를 제작하여 모든 미생물을 검출하기란 어려운 일이다. 이 논문에서 알 수 있듯이, 현재 대부분의 probe는 그 환경에 우점하고 있는 미생물을 대상으로 제작이 되고 있고, species level 이하까지도 검출할 수 있는 다양한 probe를 제작한다는 것이 쉽지 않다. 그러므로 다른 기술과 함께 적용되어 더욱 다양한 미생물을 찾아내고, 그에 적합한 probe를 제작하여 이용해야 할 것이다. probe가 다양해 질수록 더욱 다양한 장내 미생물을 검출할 수 있다는 것은 자명한 일이다.

Flow cytometry (FCM)

Flow cytometry는 전자에 설명한 FISH기술과 같이 cell에 직접 fluorescent tag를 붙이는 과정을 수반한다. 형광물질을 붙인 cell을 특정 형광 검출기에 통과시키면서 target만을 검출하게 되는데 기계에서 전자를 쏘면 형광의 유무에 따라 다른 charge를 띄게 함으로써 target들만을 골라낼 수 있다. 이렇게 해서 전체 장내 미생물 집단에서 특정 미생물의 수를 산정하는 것이 가능하다[30]. Zoetendal *et al.*[53]은 건강한

사람의 분변 샘플에서, 기존의 배양 방법으로는 검출되지 않았던 *Ruminococcus obeum*-like bacteria를 검출하기 위해 species-specific probe를 제작하여 flow cytometry를 수행하였다. FISH의 방법으로 비교실험을 수행한 결과, 유사한 결과를 도출함으로써 장내 미생물의 전체 그룹 중 target 집단만을 검출하기 위한 방법으로 안정적이고 적합한 기술 방식으로 인정되었다. Rigottier-Gois *et al.*[33]은 사람의 분변 샘플에서 우점종인 *Bacteroides* group만을 검출하기 위해 여러 개의 *Bacteroides* species-specific probe를 제작하여 Flow cytometry를 수행하였다. 기존의 배양 기술과 분자 기술을 통해 밝혀진 것과 같이, 분변 샘플내의 *Bacteroides* group은 우점종임이 드러났고, 다른 어떤 기술보다 빠르고 정확한 동정 능력을 보여준다고 설명하였다. 이러한 장점을 통해 사람에게서 보이는 병원균을 빠른 시간 내에 보다 쉽게 검출할 수 있을 것이라는 응용 가능성을 언급했다.

Microarray

최근 다루게 되는 유전자의 수와, 연구 범위가 넓어지면서 high throughput 기술이 각광 받기 시작하였고, microarray를 이용한 기술이 각 분야에 적용되고 있다. 수백 개 내지 수천 개의 유전자(oligonucleotides, cDNA, genomic DNA)를 slide glass상에 고정시키고, 알고자 하는 환경에서 추출한 DNA를 증폭시켜 형광 물질을 붙인 후 유전자의 발현 변화를 측정하는 방법이다. 이런 기술은 최근 들어 장내 미생물 연구에서도 어김없이 사용되고 있다[10, 44, 45, 48]. 한 번의 실험으로 많은 유전자의 발현 정보를 얻을 수 있으며, 유전자 구조 정보를 쉽게 알 수 있다는 장점을 가진 이 기술은, 장내와 같은 복잡한 환경 생태를 연구하기에 매우 유용하다[44]. Wang *et al.*[44]은 사람의 장내에서 우점하고 있다고 알려진 미생물 40여 종을 선별해서, species-specific oligonucleotide probe를 디자인하여 40-mer oligonucleotide-microarray slides를 제작하였다. 사람의 분변 샘플에서 얻은 DNA를 증폭시켜 형광물질을 붙인 후 hybridisation 한 결과 그 사람의 장내에 우점하고 있는 미생물을 빠르게 검출할 수 있으며, 쉽게 동정이 가능함을 알 수 있었다. 하지만 microbial diagnostic microarray 의 민감성과 특이성을 알아보기 위해, 순수 분리된 몇 종의 미생물을 섞어 추출한 DNA를 증폭시켜 hybridisation한 결과 미약한 cross-hybridization이 나타났다. 이것은 40mer의 oligonucleotide로 같은 속(genus) 내에서, 일부 짧지만 유사한 sequence를 가지고 있는 종을 구별해 내기가 어려울 뿐 아니라, PCR 증폭 시 bias가 일어나 hybridization 오류를 유발될 수 있음을 보여주는 것이다. 이런 단점을 보완하기 위해서 현재 본 연구팀은 순수 분리된 genomic DNA을 추출하여 각 probe로서 슬라이드에 고정시키고, 분석하고자 하는 신생아의 분변 샘플도 PCR 증폭 과정 없이, 직접 metagenomic DNA에 Cy5나 Cy3와 같은 형광물질을 붙여 검출하는 실험을 수행하고 있다. 이는

PCR에 의한 bias가 없을 뿐 아니라, oligonucleotide-microarray slides 보다 훨씬 더 민감한 검출 능력을 보여준다. 이렇게 microbial diagnostic microarray는 민감한 검출 능력과, 검출 시간의 단축, 자동 분석의 용이함을 지니고 있어 다양한 종류의 기능성 DNA chip 개발이 한창 진행 중에 있다.

Genome 연구

Sequence 일부를 검출하여 동정하는 방식에서 벗어나, 최근엔 미생물의 완벽한 유전자 서열을 알고자 하는 노력이 두드러진다. 이것은 미생물이 자신의 서식처의 모든 정보를 담아 자연과 커다란 연결고리를 형성하고 있을 것이라는 생각에서부터 시작되었다. 특히 장내 미생물의 연구는 인간의 장기 기관들의 역할에 중요한 지침을 줄 수 있는 표지인자로 인식되고 있다[32]. Metagenomics는 단 몇 시간 만에 한 미생물의 완벽한 유전 정보를 얻을 수 있는 기술 혁신의 승리로 장내 미생물과 숙주간의 상호 작용을 이해 이해하는데 한걸음 다가갈 수 있게 되었고[29], 인간의 진화, 발달, 면역 작용 그리고 인간의 질병과 이 질병에 노출될 수 있는 예측까지도 가능하게 될 것이다.

Paul B *et al.*[29]의 논문에 의하면 Microbial small subunit ribosomal RNA gene의 clone으로 sequence를 분석한 결과 60%가 넘는 novel gene이 검출된다고 보고하였다. 이렇게 밝혀진 새로운 종들의 80 %가 기존의 배양 방법으로는 찾기 어려운 종들이었으나 분자 생태 기술의 발달로 인하여 서서히 밝혀지고 있는 것이다. Matsuki *et al.*[41]이 “The complex microflora of the human gut is difficult to study with only primers that are specific at the species level due to the diversity of this ecosystem”라고 말했듯이 현대 분자 생태학 기술도 복잡한 환경을 완전히 알고자 하는데 많은 한계에 부딪힌다. 그러므로 위에서 언급한 많은 분자 생태 기술 말고도 더 나은 기술의 필요성이 증대 되고 있다.

요 약

인간의 장(腸)은 태어날 때만 해도 무균 상태이지만 태어나면서 산모나 주위 환경에 의해 미생물이 형성되기 시작한다. 미생물은 숙주 안에서 면역, 영양학적, 생리학적, 보호 과정 등의 특징을 유발시키며, 밀접한 상호작용을 한다[6, 24, 35]. 많은 연구를 통해 장내 미생물이 우리에게 주는 이로운 점들이 밝혀 지긴 했지만, 우리가 목표로 하는 장내 미생물이 숙주의 장내 건강 상태를 조절하는 메커니즘은 아직 뚜렷하게 밝혀 지지 않고 있다. 즉, 숙주(인간)의 건강의 상태를 결정지어 주는 장내미생물 biomarker의 확립이 아직 불분명한 상태이다. 장내미생물의 방대한 다양성으로 인하여, 이를 연구하기 위한 분자 생태학 기술의 올바른 접근과 더 나은 방향으로의 기술 발전이 필요하다. 앞으로 더 나은 기술 개발을 통해, 신생아 장내의 초기에 형성되는 미생물

을 검출하고, 여러 외부 요인에 따라 어떻게 연속되어 가면서 어떠한 역할을 하는지를 밝힐 수 있다면, 질병 치료뿐 아니라 예방도 가능해 질 것이다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부가 주관하고 있는 ‘생물소재 성과관리’를 위한 ‘기초 기술개발’ 과제(NNM0100512)의 지원을 받아 수행되었음.

REFERENCES

- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925.
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Bartosch, S., A. Fite, G. T. Macfarlane, and M. E. McMurdo. 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3575-3581.
- Bennet, R., M. Eriksson, C. E. Nord, and R. Zetterstrom 1982. Suppression of aerobic and anaerobic faecal flora in newborns receiving parenteral gentamicin and ampicillin. *Acta Paediatr. Scand.* **71**: 559-562.
- Benno, Y., K. Sawada, and T. Mitsuoka. 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Immunol.* **28**: 975-986.
- Berg, R. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4**: 430-435.
- Bezirtzoglou, E. 1997. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe* **3**: 173-177.
- Bullen, C. L., P. V. Tearle, and M. G. Stewart. 1977. The effect of “humanised” milks and supplemented breast feeding on the faecal flora of infants. *J. Med. Microbiol.* **10**: 403-413.
- Kunz, C., S. Rudloff, W. Baier, N. Klein, and S. Strobel. 2000. Oligosaccharides in human milk : structural, functional and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* **20**: 699-722.
- Chizhikov, V., A. Rasooly, K. Chumakov, and D. D. Levy. 2001. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3258-3263.
- Favier, C. F., W. M. de Vos., and A. D. Akkermans 2003. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe* **9**: 219-229.
- Favier, C. F., E. E. Vaughan, W. M. de Vos, and A. D. Akkermans 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 219-226.
- Franks, A. H., H. J. Harmsen, G. C. Raangs, G. J. Jansen, F. Schut, and G. W. Welling. 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3336-3345.
- Haarman, M., and J. Knol. 2005. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2318-2324.
- Harmsen, H. J., A. C. M. Wildeboer-Veloo, J. Grijpstra, J. Knol, J. E. Degener, and G. W. Welling. 2000. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4523-4527.
- Heilig, H. G., E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A. D. Akkermans, and W. M. de Vos. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 114-123.
- Harmsen, H. J., G. C. Raangs, A. H. Franks, A. C. M. Wildeboer-Veloo, and G. W. Welling. 2002. The Effect of the Probiotic Inulin and the Probiotic *Bifidobacterium longum* on the Fecal Microflora of Healthy Volunteers Measured by FISH and DGGE. *Microb. Ecol. Health Dis.* **14**: 211-219.
- Holzapfel, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger, and Huis in't Veld. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 85-101.
- Lay, C., M. Sutren, V. Rochet, K. Saunier, J. Dore, and L. Rigottier-Gois. 2005. Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environ. Microbiol.* **7**: 933-946.
- Ludwig, W., S. Dorn, N. Springer, G. Kirchhof, and K.H. Schleifer. 1994. PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3236-3244.
- Lundequist, B., C. E. Nord, and J. Winberg. 1985. The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatr. Scand.* **74**: 45-51.
- Ma'tto J., E. Malinen., M.-L. Suihko, M. Alander, A. Palva, and M. Saarela. 2004. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal *Bifidobacteria*. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 459-470.
- MacGregor, R. R. 3rd, and W.W. Jr. Tunnessen. 1973. The incidence of pathogenic organisms in the normal flora of the neonate's external ear and nasopharynx. *Clin. Pediatr. (Phila)* **12**: 697-700.
- Mackie, R. I., S. Alune, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal

- tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 1035S-1045S.
25. Muiyzer, G., E. C. de Waal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
 26. Torun, M. M., H. Bahar, E. Gür, Y. Tatan, M. Alikaiifolu, and A. Arvas. 2002. Anaerobic fecal flora in healthy breast-fed Turkish babies born by different methods. *Anaerobe* **8**: 63-67.
 27. Niewold, T. A., H. H. Kerstens, J. van der Meulen, M. A. Smits, and M. M. Hulst. 2005. Development of a porcine small intestinal cDNA micro-array: characterization and functional analysis of the response to enterotoxigenic *E. coli*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **105**: 317-329.
 28. Brigidi, P., B. Vitali, E. Swennen, G. Bazzocchi, and D. Matteuzzi. 2001. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res. Microbiol.* **152**: 735-741.
 29. Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, D. A. Relman. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308(5728)**: 1635-1638.
 30. Namsolleck, P., R. Thiel, P. A. Lawson, K. Holmström, M. Rajilic, E. E. Vaughan, L. Rigottier-Gois, M. D. Collins, W. M. de Vos, and M. Blaut. 2004. Molecular methods for the analysis of gut microbiota. *Microb. Ecol. Health Dis.* **16**: 71-85.
 31. Reid, G., J. Jass, M. T. Sebulsky, and J. K. McCormick. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 658-672.
 32. Relman, D. A. and S. Falkow. 2001. The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends Microbiol.* **9**: 206-208.
 33. Rigottier-Gois, L., V. Rochet, N. Garrec, A. Suau, and J. Dore. 2003. Enumeration of *Bacteroides* species in human faeces by fluorescent in situ hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 110-118.
 34. Roc' o Mart'na, S. L., M. A. Carlota Reviriegoa, E. Jim'e' neza, M. N. O. L. Mar' na, J. S. J. N. Julio Bozab, L. Ferna' ndeza, J. X. A. Juan, and M. Rodr'guez. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **15**: 121-127.
 35. Mackie, R. I., S. Alune, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 1035S-1045S.
 36. Sakata, S., T. Tonooka, S. Ishizeki, M. Takada, M. Sakamoto, M. Fukuyama, and Y. Benno. 2005. Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to *Bifidobacterium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**: 417-423.
 37. Meance, S., C. Cayuela, A. Raimondi, P. Turchet, C. Lucas, and J. M. Antoine. 2003. Recent advances in the use of functional foods: effects of the commercial fermented milk with *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 and yoghurt strains on gut transit time in the elderly. *Microb. Ecol. Health Dis.* **15**: 15-22.
 38. Simhon, A., J. R. Douglas, B. S. Drasar, and J. F. Soothill. 1982. Effect of feeding on infant's faecal flora. *Arch. Disease in Childhood* **57**: 54-58.
 39. Songjinda, P., J. Nakayama, Y. Kuroki, S. Tanaka, S. Fukuda, C. Kiyohara, T. Yamamoto, K. Izuchi, T. Shirakawa, and K. Sonomoto. 2005. Molecular monitoring of the developmental bacterial community in the gastrointestinal tract of Japanese infants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 638-641.
 40. Sprunt, K. and G. Leidy. 1988. The use of bacterial interference to prevent infection. *Can. J. Microbiol.* **34**: 332-338.
 41. Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Miyamoto, T. Takada, K. Matsumoto, H. Oyaizu, and R. Tanaka. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5445-5451.
 42. Tannock, G. W. 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends Biotechnol.* **15**: 270-274.
 43. Tannock, G.W., R. Fuller, S. L. Smith, and M. A. Hall. 1990. Plasmid profiling of members of the family *Enterobacteriaceae*, *Lactobacilli*, and *Bifidobacteria* to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J. Clin. Microbiol.* **284**: 1225-1228.
 44. Wang, R. F., M. L. Beggs, B. D. Erickson, and C. E. Cerniglia. 2004. DNA microarray analysis of predominant human intestinal bacteria in fecal samples. *Mol. Cell Probes* **18**: 223-234.
 45. Wang, R. F., M. L. Beggs, L. H. Robertson, and C. E. Cerniglia. 2002. Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *FEMS Microbiol. Lett.* **213**: 175-182.
 46. Wang, R. F., S. J. Kim, L. H. Robertson, and C. E. Cerniglia. 2002. Development of a membrane-array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *Mol. Cell Probes* **16**: 341-350.
 47. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
 48. Wu, L., D. K. Thompson, G. Li, R. A. Hurt, J. M. Tiedje, and J. Zhou. 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5780-5790.
 49. X. W. Huijdsens, R. K. Linskens, J. Koppes, Y. L. Tang, S. G. Meuwissen, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and P. H. Savelkoul. 2004. Detection of *Helicobacter* species DNA by quantitative PCR in the gastrointestinal tract of healthy individuals and of patients with inflammatory bowel disease.

- FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **41**: 79-84.
50. Yoshioka, H., K. Iseki, and K. Fujita. 1983. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* **72**: 317-321.
51. Hingoh, Y., M. Ohkuma, and T. Kudo. 2003. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**: 231-242.
52. Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans, and W. M. De Vos. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3854-3859.
53. Zoetendal, E. G., K. Ben-Amor, H. J. Harmsen, F. Schut, A. D. Akkermans, and W. M. de Vos. 2002. Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4225-4232.

(Received Aug. 2, 2005/Accepted Sep. 12, 2005)