

양식 넙치에서 분리한 *Staphylococcus epidermidis*의 생물학적 및 생화학적 특성

심두생, 정승희*, 박형숙**, 전세규***

국립수산진흥원 남해수산연구소, *국립수산진흥원 병리과

경성대학교 생물학과, *한국어병연구소

최근 7월부터 9월사이 고수온기에 경남일대의 육상수조식 넙치양식장에서 8균주의 *Staphylococcus epidermidis*를 분리하여 이들의 생물학적 및 생화학적 특성을 알아보았다.

분리균주는 BHIA, HIA, *Staphylococcus* No. 110 및 ETGP에서 잘 발육하였으며, 식염농도 2.0~3.0%, 30°C 전후 그리고 pH는 7.0 전후에서 발육상태가 좋았다. 또한 DNase, coagulase에는 전 균주가 음성이었으며, 용혈성은 FSJ-2균주만이 약한 음성을 나타내었고, ureas 양성, novobiocin 저항성에는 음성을 나타내었다.

탄수화물의 분해능에서 전 균주는 가스를 생산하지 않았고 혐기적 조건하에서 포도당과 maltose를 분해하였으며 mannitol은 FSJ-19균주만이 약하게 분해한 것을 제외하고는 전 균주가 음성이었다. 호기적 조건하에서 전 균주는 포도당, fructose, galactose, sucrose, maltose 및 dextrin을 분해하였다.

분리균주의 임상적인 주요 특성에서 8개의 균주는 4가지의 다른 biotype code를 나타내었으며, 약제 감수성 그룹에서도 4가지의 다른 패턴을 나타내었다.

이상의 결과는 Bergey's manual of systematic bacteriology에 기재된 *S. epidermidis*의 coagulase, urease, DNase, β -galactosidase, novobiocin 저항성 및 포도당의 혐기적 분해성과 잘 일치하였고, 또한 Mickelsen *et al.*(1985)이 기재한 biotype과 약제 감수성 패턴이 잘 일치하여 본 분리균을 *S. epidermidis*로 동정하였다.

Key Words : *Staphylococcus epidermidis*, coagulase, urease, DNase, β -galactosidase, novobiocin

포도상구균은 1883년 Sir Alexander Ogaston에 의해 사람의 화농성 종기에서 발견된 포도상의 구균을 "staphylococci"로 묘사한 것에서 비롯되었다. 1884년 Rosenbach는 이 균의 속명을 *Staphylococcus*, 종명을 *aureus*로 명명하였으며 이 병원체가 오렌지색과 흰색, 두가지 색의 집락을 형성하므로 각각 *Staphylococcus pyogenes aureus*와 *Staphylococcus pyogenes albus*라고 명명하였고, 1년 후에는 레몬색의 집락을 형성하는 균을 발견, 이를 *Staphylococcus pyogenes citreus*로 명명하였다. 그러나 1891년 *S. pyogenes albus*는 *Staphylococcus epidermidis albus*로

바뀌어졌다(Watanakunakorn and Hamburger, 1970).

초기의 분류는 집락의 형태와 색에 의존하였으나, 1905~1906년에 Andrews와 Gordon은 색소생성과 기니아 쪽에 병원성을 가지는 것에 의해 staphylococci를 4종으로 분류하였다. 즉 *S. pyogenes*(오렌지색, 열은 황색 혹은 흰색, 높은 병원성), *S. epidermidis albus*(흰색, 약한 병원성)와 회고 병원성이 없는 다른 2종으로 분류하였다(Parisi, 1985).

그러나 1923년에 출판된 Bergey's manual of Determinative Bacteriology에서는 *S. pyogenes aureus*가 *Mic-*

*rococcus aureus*로, *S. pyogenes albus*는 *Micrococcus pyogenes*로 개명되었다.

1903년 Loeb는 *S. pyogenes aureus*가 거위의 혈장을 응고시킬 수 있다 하였고, 1908년 Much는 토끼와 말의 피로써 이 실험을 반복하여 혈장이 응고되는 같은 결과를 얻었으나 Bergey's manual 7판이 발행된 1957년까지도 coagulase 생산에 의한 혈장의 응고유무가 분류의 기준으로 채택되지 못하였다. 그러는 동안 *Staphylococcus saprophyticus*라는 균이 coagulase를 생산하지 못하여 혈장을 응고시킬 수 없는 것에 의해 이 균은 staphylococci의 coagulase-negative균주로 제외되었고, micrococci는 전 균주가 전혀 coagulase를 생산하지 못하는 점에서 *Micrococcus*는 staphylococci의 속명으로는 적합하지 않은 것으로 주장하였다(Shaw *et al.*, 1951). 1950년대 중반 staphylococci의 분류에 많은 학자들(Evans *et al.*, 1955; van Eseltine, 1955; Breed, 1956; Thatcher and Simon, 1957)이 새로운 관심을 나타내었고, 여러가지 출판물에서 *Micrococcus*로부터 *Staphylococcus*를 분리하려는 관점이 나타났다. Evans *et al.*(1955)은 staphylococci가 혐기적으로 성장하고, glucose로부터 산을 생산할 수 있는 능력에 의해 micrococci로부터 분리할 수 있다고 제안하였다. *S. aureus*와 *S. epidermidis*는 mannitol을 혐기적으로 이용하기도 하고, coagulase를 생산하는 것 등에 기초를 두어 인식하게 됨으로써 micrococci와 staphylococci를 분리하는 문제는 해결되게 되었다.

최근에야 비로소 많은 종이 밝혀지기 시작한 coagulase-negative staphylococci(CNS)는 대부분 거의 병원성을 가지고 있지 않다고 알려져 있다(Kloos and Schleifer, 1975; Schleifer and Kloos, 1975). 그러나 CNS는 감염원으로부터 가장 빈번하게 분리되는 중이며, 환경의 어디에서나 존재하고 있고 인체의 피부나 외비공에도 존재하고 있는 *Staphylococcus epidermidis*는 다른 CNS와는 달리 심막막 인공밸브(Masur and Johnson, 1980), 뇌척수 분합(Schoenbaum *et al.*, 1975), 보조관절(Willson, 1977), 인공혈관의 수술시 상처(Liekweg and Greenfield, 1977; Blous *et al.*, 1978)에 감염되고 요도 감염(John *et al.*, 1978)의 중요한 병원체로 보고되고 있

다. 또한 이 균은 골수 이식수술(Young, 1981)을 겪은 환자나 외부로부터 영양을 공급받는 태아(Sanders and Sheldon, 1976)의 혈액에 보통 나타나는 병원체로 알려져 있다.

이와 같이 인체에 감염되는 병원체가 최근 7월에서 9월사이의 고수온기에 육상수조식 넙치 양식장에서 체색이 검게 되고 안구돌출과 출혈의 증상을 나타내는 병어에서 분리되었다. 본 연구는 이 병에 자연감염된 양식넙치로부터 원인균을 분리하고 병징의 재현성을 나타내는 균주를 사용하여 이들의 생물학적 특성과 생화학적 특성을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 원인균에 관한 성상시험

가. 분리배양

원인균은 자연감염된 넙치의 신장, 비장, 뇌, 혈액 및 체표 궤양 부위를 백담이로 찌른 후 nutrient agar(NA, Difco), tryptic soy agar(TSA, Difco) 및 brain heart infusion agar(BHIA, Difco)의 평판배지에 도말하여 35°C에서 24시간 배양한 후 분리하였다.

나. 재현성 시험

재현성 시험은 세균검사에 의해 출현한 콜로니에서 27 균주를 선택하여 실시하였다. 즉 brain heart infusion broth(BHIB, Difco)에 35°C에서 24시간 배양한 균을 3,000rpm으로 30분간 원심한 후 집균하였다. 집균한 것을 phosphate-buffered saline(PBS)에 현탁시켜, 건강한 넙치(평균체중 106±15g)에 체중 10g당 10⁸~10¹⁰ viable cells/ml를 복강과 근육 접종하였다. 접종한 넙치는 유수식 fiberglass reinforced plastics(FRP) 육상수조(500ℓ 들이)에 수용하고 수온 25.0±3.0°C에서 10일간 사육하여 폐사 유무 및 외관 증상을 매일 확인하였다. 또 증상 발현어와 폐사어에 대하여는 해부하여 병변을 관찰함과 함께 신장, 혈액 및 비장에서 접종균의 재분리를 시도하였다.

병원성 시험은 재현성이 확인된 8균주를 분리하여 건

강한 넙치(평균체중 $106 \pm 15g$, 1병원성 균주당 5~10마리)에 체중 10g당 균 접종량 10^6 viable cells/ml를 복강과 근육에 접종하여 10일 이내에 시간별 폐사어를 조사하였다.

다. 제공된 균주

재현성이 확인된 넙치로부터 재분리한 8균주와 대조 균주 *S. epidermidis* ATCC 12228을 각종 성장실험에 사용하였다. 각 균주의 유래는 표 1에 보는 바와 같다.

Table 1. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*

Isolated strains	Date sampled	Location	Source
FSJ-2	8/2/89	Yangsan	Kidney
FSJ-3	9/1	Yangsan	Region of ulcer
FSJ-11	8/1	Namhai	Kidney
FSJ-12	8/1	Namhai	Spleen
FSJ-19	7/6	Ulju	Spleen
FSJ-29	8/19/90	Yangsan	Spleen
FSJ-32	8/19	Ulju	Kidney
FSJ-33	8/23	Yangsan	Kidney

Reference strains
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 KFCC*

* Korean Federation of Culture Collections of Microorganism.

라. 형태학적 성장과 생물학적 성장 검사

2% 식염첨가 BHIA 사면배지와 BHI broth에 접종하여 35°C, 24시간 동안 배양한 균주를 사용하여 그람 염색성(Hücker변법), 운동성, 형태, 크기 및 색소생산 등 형태학적 성상을 검사하였다.

생물학적 성장검사에서는 각종 배지상에서 35°C에 3일간 배양하여 발육여부를 관찰하였다. 발육에 미치는 식염농도, 온도 및 pH의 영향실험에서는 펩톤수에 각 균주를 접종하여 35°C, 24시간 배양한 후 630nm에서 흡광도를 측정하여 발육도로 하였다.

마. 생화학적 성장검사

생화학적 성장검사는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1986)와 Manual for the identification of medical bacteria(1974)에 준하여 Manual of methods for general bacteriology(1981)와 Biochemical tests for identification of medical bacteria(1980)에 기재된 방법에 따라 실시하였다.

2. 분리균주의 임상적 특성시험

가. API Staph-Ident System에 의한 동정

분리균주의 임상적 특성에 따른 동정과 biotype을 알고자 가수분해 기질을 포함하여 20개의 microcupule(7-digit profiles)로 구성된 API Staph-Ident(Bio Mérieux Sa, France)를 사용하였다. McFarland 3번의 밀도로 희석한 분리균주를 각 microcupule에 접종하여 35°C에서 18시간 배양한 후 반응 유무를 조사하였다.

나. 약제 감수성 시험

전 분리균주의 약제 감수성은 미국의 National Committee for Clinical Laboratory Standards에서 공인된 디스크 확산법에 의해 측정하였다.

결 과

1. 원인균의 성장에 관한 연구

가. 분리 배양 및 재현성

자연감염된 넙치로부터 BHIA배지상에서 주연이 원활하며 백색 또는 오렌지색의 집락을 분리. 순수배양한 분리균주 8주 각각에 대하여 병원성의 재현을 시험한 결과는 표 2에서 보는 바와 같다. 분리균주 모두는 80~100%의 폐사율을 나타내었으며, 폐사한 넙치의 치사시간은 균접종 후 90~122시간이었으며 폐사어의 외관 및 해부 증상(그림 1)은 안구가 돌출되고, 간의 울혈, 창자의 염증, 일부는 비장, 신장의 팽대도 보여 자연감염어(그림 2)와 같은 증상을 나타내었다. 또 폐사어의 비장, 신장 및 혈액에서 점종균과 동일한 성상의 세균을 재분리하였다. 이상의 결과에서 이러한 분리균들을 본 병의 원인균으로 생각하였다.

Fig. 1. Dissected view of the flounder *Paralichthys olivaceus* which appeared 48hrs after intramuscular injection with isolated *Staphylococcus epidermidis*. The fish exhibits exophthalmos, congestion of liver and inflammation of digestive organ.

Fig. 2. Dissected view of the cultured flounder *Paralichthys olivaceus* infected with *Staphylococcus epidermidis*. The fish exhibits exophthalmos with hemorrhage, and swelling of kidney and spleen.

Table 2. Pathogenicity of the isolated strains to cultured flounder, *Paralichthys olivaceus* (Dose 10^9 viable cells/ml/10g BW, intraperitoneal and intramuscular injection)

Strains	Fish numbers (died/tested)	Mortality (%)	Average time to death (hrs)
FSJ-2	10/10	100	92
FSJ-3	10/10	100	90
FSJ-11	4/5	80	122
FSJ-12	4/5	80	96
FSJ-19	4/5	80	120
FSJ-29	8/10	80	90
FSJ-32	9/10	90	96
FSJ-33	4/5	80	96

나. 재분리균의 성장

1) 형태학적 및 생물학적 성장

제공된 균주를 그람염색한 결과 모두가 단구, 쌍구 및 포도구균의 형태로 배열되어 있었으며(그림 3), 크기는 $0.6\sim 1.9\mu\text{m}$ 이었다. 제공된 균주의 형태학적 및 생물학적 성장은 표 3에서 나타난 바와 같다. 35°C 에서 충분히 발육한 BHIA 평판위의 집락형태는 불록하였으며 주연이 원활하였고 집락의 크기는 $1.8\sim 4.2\text{mm}$, 집락의 색깔은 백색 또는 옅은 노란색이었다.

Fig. 3. Morphology of the isolated *Staphylococcus epidermidis* cultured in BHIA at 35°C for 24hrs. Gram stain, $\times 1,000$.

전 균주는 그림양성, 비운동성이었으며 BHIA, HIA, *Staphylococcus* No. 110(日本) 및 Baird-Parker의 egg yolk tellurite glycine pyruvate agar(ETGP)에서 잘 발육하였다. 또, 0~3% 식염첨가 NA에서 전 균주가 발육하였으나, 10% 식염첨가 NA에서는 FSJ-2, FSJ-19주는 발육하지 않았고 그 외의 균주는 약하게 발육하였다. 10% bile heart infusion agar(HIA)와 phenylethyl alcohol agar에서 전 균주가 발육하였다. 40% bile HIA에서는 FSJ-11와 FSJ-12균주만이 발육하지 않았고 그 외의 균주는 잘 발육하였다. salt egg yolk agar(SE, 日本), 구연산염, bromthymol blue(BTB) teepol agar, MacConkey agar에는 전 균주가 발육하지 않았다. 0.03% potassium tellurite첨가 HIA배지에는 FSJ-12균주만 약하게 발육하고 그 외는 발육하지 않았다. NA에 있어서 전 균주가 37~45°C에서는 발육하였으나 10°C에서는 FSJ-3주만이 약하게 발육하였을 뿐 그 외의 균주는 발육하지 않았다.

발육에 대한 식염농도, 온도 및 pH의 영향은 그림 4~그림 6에 보는 바와 같다. 균주에 따라 발육성에 차이는

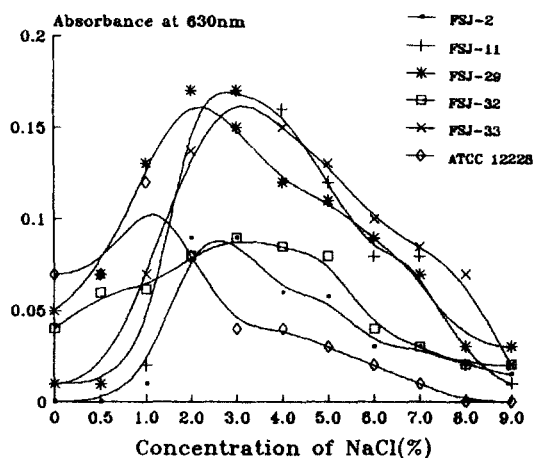


Fig. 4. Effects of NaCl concentration on the growth of selected *Staphylococcus epidermidis* isolates from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*. 1% peptone water controlled final pH 7 was used as culture media and incubated for 24hrs at 37°C.

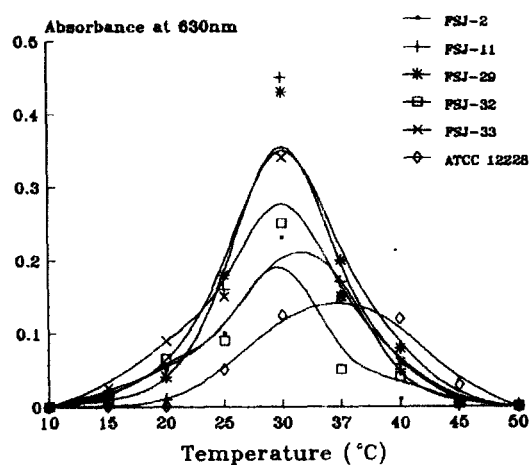


Fig. 5. Effects of temperature on the growth of selected *Staphylococcus epidermidis* isolates from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*. 1% peptone water controlled final pH 7 was used as culture media and incubated for 24hrs.

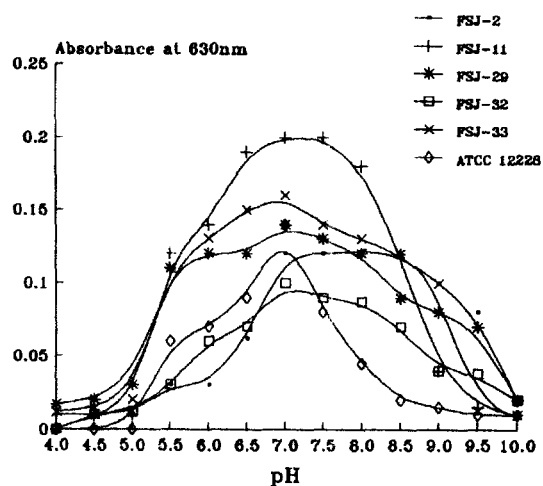


Fig. 6. Effects of pH on the growth of selected *Staphylococcus epidermidis* isolates from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*. 1% peptone water was used as culture media and incubated for 24hrs at 37°C.

있었으나 0~9.0%의 범위에서 발육하였고, 최적발육 식염농도는 2.0~3.0%이었다. 배양온도는 15~45°C이었으며 최적발육온도는 30°C 전후이었다. 또, pH4.0~10.0에서 발육하였으며 최적발육 pH는 7.0 전후이었다.

Table 3. Morphological and biological characteristics of the isolates from diseased flounder and *S. epidermidis* ATCC 12228

Characteristics	FSJ-2	FSJ-3	FSJ-11	FSJ-12	FSJ-19	FSJ-29	FSJ-32	FSJ-33	ATCC 12228
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Colony pigment	Wh	Wh	Wh	Wh	Or	Wh	Wh	Wh	Wh
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on :									
BHIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Staphylococcus									
110	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BTB Teepol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.03% PT HIA	-	-	-	+ ^w	-	-	-	-	-
SE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETGP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0% NaCl NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	+ ^w	-	+ ^w	+ ^w	-	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w
15% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10% Bile HIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40% Bile	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Phenylethyl alcohol agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Simmon's citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Koser's citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at :									
10°C	-	+ ^w	-	-	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+ ^w	+	+	+	+	+	+
50°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W : Weak reaction, Or : Orange, Wh : White.

2) 생화학적 성장

제공된 균주의 생화학적 성상은 표 4에서 보는 바와 같다. 전 균주는 Catalase에 양성, cytochrome oxidase에 음성이었으며 포도당을 발효적으로 분해하였으나 indole은 생산하지 않았다. methyl red(MR) 및 질산염 환원에서는 FSJ-11, FSJ-12 및 FSJ-19만이 음성이었다. 황화수소와 가스는 어느 균주도 생산하지 않았으

며, Kligler's iron agar(KIA)에 산을 생산하였다. vogusposkauer(VP)는 FSJ-19주만이 음성이었으며, phosphatase는 FSJ-19와 FSJ-29주만이 음성이었다. deoxyribonuclease(DNase), coagulase는 전 균주가 음성, 용혈성은 FSJ-2주만이 음성이었고 그 외의 전 균주는 양성이었다. 2,3butanediol과 urease는 전 균주가 양성, novobiocin 저항성과 β -galactosidase에는 전 균주가 음

Table 4. Biochemical characteristics of the isolates from diseased flounder and *S. epidermidis* ATCC 12228

Characteristics	FSJ-2	FSJ-3	FSJ-11	FSJ-12	FSJ-19	FSJ-29	FSJ-32	FSJ-33	ATCC 12228
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cytochrom oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hugh-Leifson	F ^w	F	F	F	F	F	F	F	F
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR testose	+	+	-	-	-	+	+	+	+
VP reaction	+	+	+	+	-	+ ^w	+ ^w	+	+
KIA :	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Gas/H ₂ S	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Nitrate reduction	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Phosphatase	+	+	+ ^w	+ ^w	-	-	+	+	+ ^w
DNase	-	-	-	-	-	- ^w	-	- ^w	-
2,3 Butanediol	+ ^w	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemolysis(sheep)	- ^w	+ ^w	+	+	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w
Coagulase(rabbit)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Purple milk	-	-	-	-	A	AC	AC	A	A
Hydrolysis of									
Arginine	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Casein	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	+ ^w	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	-	-	+	+	-	-
L-arginine HCl	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L-Lysine HCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ornithine HCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PPA test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPPA test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -Galactosidase	-	-	-	-	- ^w	-	-	-	-
Pigment reduction	-	-	-	-	+ ^w	-	-	-	-
Novobiocin resist.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W : Weak reaction, A : Acid, F : Fermentation, C : Coagulation.

성이었다. arginine가수분해는 FSJ-19주만이 음성, gelatin은 전 균주가 음성이었으며, esculin은 FSJ-2주만이 약한 음성을 나타내었다.

제공된 균주의 각종 탄수화물 분해능은 표 5에서 보는 바와 같다. 전 균주가 탄수화물로부터 가스를 생산하지 않았다. 혐기적 조건하에서 전 균주는 포도당과 maltose를 분해하였고 lactose는 FSJ-3, FSJ-11 및 FSJ-12균주만이 분해하였다. 호기적 조건하에서는 포도당,

fructose, galactose, sucrose, maltose 및 dextrin은 전 균주가 분해하였다. xylose는 FSJ-29와 FSJ-32주만이 분해하였고, mannose는 FSJ-3, FSJ-19 및 FSJ-29주가 분해하였으며, lactose는 FSJ-2, FSJ-19 및 FSJ-29가 분해하였다. trehalose는 FSJ-3주만이 분해하였고, adonitol은 FSJ-3과 FSJ-33이, mannitol은 FSJ-19만이 분해하였다. 그러나 arabinose의 8종의 탄수화물은 전 균주가 분해하지 않았다.

Table 5. Carbohydrate utilization of the isolates from diseased flounder and *S. epidermidis* ATCC 12228

Characteristics	FSJ-2	FSJ-3	FSJ-11	FSJ-12	FSJ-19	FSJ-29	FSJ-32	FSJ-33	ATCC 12228
Gas production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid (anaerobically)from									
Glucose	A	A	WA	WA	A	A	A	A	A
Lactose	WA	-	-	-	A	WA	WA	A	A
Maltose	WA	A	A	A	A	A	WA	A	A
Mannitol	-	-	-	-	WA	-	-	-	-
Acid (aerobically)from									
Glucose	A	A	WA	WA	A	A	A	A	A
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	WA	WA	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	WA	A	WA	A	A	A	A	A	A
Mannose	-	WA	-	-	WA	A	-	-	A
Galactose	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Lactose	WA	-	-	-	A	WA	-	A	A
Sucrose	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Maltose	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Trehalose	-	WA	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Adonitol	-	WA	-	-	-	-	-	WA	-
Mannitol	-	-	-	-	WA	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ducitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W : Weak reaction, A : Acid.

Table 6. Characterization of clinically significant isolates of *S. epidermidis* from diseased flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Isolated strains	Isolate		API* Staph 7-digit profiles (Biotype)	Antibiotic susceptibility**					Susceptibility group
	Date	Site		Chl	Em	Cl	Gm	Mt	
FSJ-2	8/2/89	Kidney	6706113	R	S	S	R	R	II
FSJ-3	9/1	Ulcer	6706113	R	S	S	R	R	II
FSJ-11	8/1	Kidney	6204113	R	R	R	S	S	III
FSJ-12	8/1	Spleen	6204113	R	R	R	R	R	I
FSJ-19	7/6	Spleen	6721012	S	S	S	R	R	V
FSJ-29	8/19/90	Spleen	6706113	R	S	S	R	R	II
FSJ-32	8/19	Kidney	6706113	R	S	S	R	R	II
FSJ-33	8/23	Kidney	6606113	R	R	R	R	R	I

* Analytical Profile Index

** Isolates were susceptible(S) to tetracycline and vancomycin and resistant(R) to penicillin.

Chl=chloramphenicol ; Em=erythromycin ; Cl=clindamycin ; Gm=gentamicin ; and Mt=methicillin.

2. 분리균주의 임상적 특성

API Staph-Ident내의 20개 microcupule과 분리균주와의 반응결과에 의해 작성된 7-digit biotype code와 약제 감수성그룹의 결과는 표 6에서 보는 바와 같다. 시험에 사용된 8균주는 4가지의 다른 biotype code를 나타냄에도 불구하고 전부 *S. epidermidis*의 특성을 나타내었다. 4가지의 다른 biotype code는 6706113이 4균주(FSJ-2, 3, 29, 32), 6204113이 2균주(FSJ-11, 12), 6721012가 1균주(FSJ-19) 그리고 6606113이 1균주(FSJ-33)이었다.

8개의 분리균주는 4가지의 다른 항생물질 감수성패턴을 나타내었는데 FSJ-2, 3, 29, 32균주는 II 그룹에, FSJ-12와 33균주는 I 그룹에, FSJ-11균주는 III 그룹 그리고 FSJ-19는 V 그룹에 속하였다. 그러나 IV 그룹에 속하는 균주는 없었다.

고 찰

staphylococci의 분류학적 위치가 확립된 것은 Evans

et al.(1955)이 micrococci중에는 혐기적 조건하에서의 발육과 포도당을 발효적으로 분해하여 산을 생산하는 균주를 micrococci와 구별하여 staphylococci로 분류할 수 있다는 보고가 있는 이후부터였다. 또 그들은 staphylococci중 coagulase 양성균주를 *Staphylococcus aureus*로, 음성균주를 *S. epidermidis*로 분류하였다. 이 Evans *et al.*의 분류법이 1957년 *Bergey's Manual* 7판에 기재된 이후 *Staphylococcus*가 하나의 속으로서 인정받게 되었다. 더불어 1960년대 중반부터 여러 연구자들(Auletta and Kennedy, 1966 ; Bohacek *et al.*, 1967 ; Motensen and Kocur, 1967)은 세균의 deoxyribonucleic acid(DNA) 염기조성의 차이를 staphylococci의 분류에 이용하기 시작하였다. 그 결과 *S. aureus*와 *S. epidermidis*균주의 guanine과 cytosine(G+C)의 분자량은 31~40mol%, *Micrococcus*균주들의 G+C는 64~74mol% 라는 DNA염기조성의 차이를 확인하고는 *Staphylococcus*와 *Micrococcus*를 2개의 분명한 그룹으로 나누었다.

*Staphylococcus epidermidis*에 대한 세부적인 연구를 수행함으로써 1 포도당이 포함되어 있는 표준 및 복합

Table 7. The main characteristics of the present isolates compared with those of *Staphylococcus* group.

Character-istics	Present isolates	Bergey's manual(Systematic, 1986)				Cowan & steel's(1974) Kusuda(1981)		
		<i>aureus</i>	<i>epidermis</i>	<i>haemolyticus</i>	<i>saprophyticus</i>	<i>aureus</i>	<i>epidermidis</i>	<i>epidermidis</i>
Anaerobic growth	+	+	+	(+)	(+)	+	W	+
Growth on 10% NaCl agar	6/8*	+	W	+	+			+
Growth on 15% NaCl agar	-	W	-	d	d			+
Growth at 45C	+	+	+	+	d			+
VP	1/8					+	d	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	5/8	+	+ ^w	d	-	+	d	4/6
Phosphatase	6/8	+	+	-	-	+	d	3/6
Urease	+	+ ^w	+	-	+	+	d	4/6
Coagulase	-	+	-	-	-	+	-	-
Hemolysis	7/8	+	- ^w	+	(d)			+
DNase	-	+	- ^w	ds	- ^w			-
β-galactosidase	-	-	-	-	+			4/6
Novobiocin resistance	-	-	-	-	+			
Hydrolysis of								
Gelatin	-	+			d	+	d	4/6
Arginine	7/8	+	+		d	+	+	3/6
Acid from (anaero.)								
Glucose	+	+	+		(+)	+	+	+
Lactose	5/8	+						4/6
Mannitol	-	+	-		-	+	-	1/6
(aero.)								
Lactose	4/8	+	d	d	d	+	d	4/6
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	1/8	+	-	d	d	+	d	1/6
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	5/6
Xylose	2/8	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	3/8	+	(+)	-	-			3/6
Trehalose	-	+	-	+	+			2/6
Galactose	+	+	d	d	-			+

W : Weak reaction. d : 11~89% strains positive. ds : Test different. () : Delayed reaction. * : NO. of strains positive/No. of strains tested.

배지에서 혐기적으로 성장할 수 있는 능력 ② coagulase의 비생산 ③ mannitol의 비발효 ④ uracil을 혐기적으로 요구 ⑤ nitrate의 nitrite로의 환원 ⑥ 성장에 필요한 biotin 요구 등의 특성을 확립하였다. 그러나 어떤 분리균주들은 이러한 성질을 가지는 것이 다소 부족하였다(Jones *et al.*, 1963). CNS의 異種 그룹내에 특이한 타입을 처음 인식한 Baird-parker(1965)는 staphylococci를 6개의 서브그룹으로 나누었는데 subgroup I 에는 *S. aureus*를 포함시켰다. subgroup II에서 VI까지는 단지 *S. epidermidis*만을 포함시켰는데 phosphatase, acetoin생산, lactose, maltose와 mannitol의 호기적인 분해를 기준으로 삼아 구분하였다.

또 최근에 많은 연구자들(Schleifer and Kocur, 1973; Kloos and Musselwhite, 1975; Kloos and Schleifer, 1975; Schleifer *et al.*, 1979; Kloos and Wolfshol, 1982; Kloos and Jorgensen, 1985; Kloos, 1980, 1986; Schleifer, 1986)은 형태학적 생화학적 그리고 생리학적 특성과 세포벽의 peptidoglycan과 teichoic acid의 구성에 기초를 두어 coagulase-negative staphylococci를 21종으로 재정의하였다. *S. epidermidis*에 속하는 species group은 *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saccharolyticus*, *S. warnei*, *S. capitis* 및 *S. caprae*로 구성되어 있으며, *S. saprophyticus*에 속하는 species group은 *S. saprophyticus*, *S. cohnii* 및 *S. xylosus*로 구성되어 있다. *S. simulans*의 species group은 *S. simulans*와 *S. carnosus*로 되어있고, *S. siuri*의 species group은 *S. siuri*와 *S. lentus*로 구성되어 있다. *S. auricularis*는 *S. epidermidis*의 species group과 밀접하게 연관되어 있으나 속하지는 않고, *S. arlettae*, *S. equorum*, *S. gallinarum* 및 *S. kloosii*는 *S. saprophyticus*의 species group과 연관되어 있다. *S. caseolyticus*와 *S. hyicus*는 어느 species group에도 포함되어 있지 않다(Pfaller and Herwaldt, 1988).

본 연구에서는 현재 포도상구균의 분류법으로서 인정하고 있는 Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 2(1986)과 Cowan and Steel's manual 제 2판(1974)의 기재 및 Kusuda and Sugiyama(1981)이 보고한 것과 본 균에 자연감염된 넙치로부터 분리한 균주의 주

요성상을 비교하여 분류학적 위치를 검토한 결과는 표 7에서 보는 바와 같다. 분리균주의 성상은 Bergey's manual of systematic bacteriology의 *S. epidermidis*에 관한 기재와 비교하여 coagulase, urease, DNase, β -galactosidase, novobiocin resistance, 혐기적으로 포도당을 발효 분해하는 것, mannitol의 미분해, 호기적으로 maltose를 분해하는 것 및 trehalose의 미분해성에서는 일치하나, 질산염의 환원에서는 3개의 균주, phosphatase에서는 2개의 균주, arginine의 가수분해에서는 1개의 균주, 그리고 혐기적으로 lactose를 분해하는 것에서는 3개의 균주가 다른 성상을 나타내었다. 또한 전 균주가 혐기적으로 충분히 발효하고, 포도당을 발효적으로 강하게 분해하며 호기적으로 trehalose를 분해하지 않고 galactose를 강하게 분해하므로 *S. haemolyticus*와 *S. saprophyticus*와는 차이가 있는 것으로 추정하였다.

분리균주와 Cowan and Steel's manual의 *S. epidermidis*기재와 비교하여 보면 전 균주가 coagulase, 포도당의 발효적 분해성 및 호기적인 maltose, sucrose의 분해성에서는 잘 일치하며 arginine의 가수분해성에서는 1개의 균주만이 다른 성상을 나타내었다.

분리균주와 Kusuda and Sugiyama(1981)이 보고한 *S. epidermidis*를 비교하여 보면 coagulase, DNase, 포도당의 발효적 분해성 그리고 maltose와 galactose의 호기적 분해성에서는 잘 일치하였으며 그 외 일부만이 다소 상이한 성상을 보이기는 하였으나 큰 차이는 아니었다.

또한 분리균주에 대한 API Staph-Ident System의 biotype과 약제 감수성그룹의 패턴에서 Mickelsen *et al.* (1985)이 보고한 결과와는 큰 차이점은 없었다.

이상의 결과에서 본 병에 자연감염된 넙치로부터 분리한 균주를 *S. epidermidis*로 동정하였다.

참 고 문 헌

- Auletta, A. E. and E. R. Kennedy : Deoxyribonucleic acid composition of more members of the Micrococcaceae. *J. Bacteriol.* **92** : 28~34, 1966.
- Baird-Parker, A. C. : Staphylococci and their classi-

- fication. Ann. N. Y. Acad. Sci. 128 : 4~25. 1965.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** : First ed., 1923 ; 7th ed., 1957. Williams & Willkins, Baltimore.
- Blouse, L. E., G. D. Lathrop, L. N. Kolonei and R. M. Brockett** : Epidemiologic features and phage types associated with nosocomial infections caused by *Staphylococcus epidermidis*. Zentrabl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A. 241 : 119~135. 1978.
- Bohacek, J., M. Kocur and T. Martinec** : DNA base composition and taxonomy of some micrococci. J. Gen. Microbiol. 46 : 369~379. 1967.
- Breed, R. S.** : *Staphylococcus pyogenes* Rosenbach. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 6 : 35~42. 1956.
- Cowan, S. T.** : Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Cambridge Univ. Press. 47~50. 1956.
- Evans, J. B, W. L. Bradford and C. F. Niven, Jr.** : Comments concerning the taxonomy of the genera *Micrococcus* and *Staphylococcus*. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 5 : 61~66. 1955.
- Gerhardt, P., R. G. E. Murry, R. H. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips** : Manual of methods for general bacteriology. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D. C., 524 pp. 1981.
- John, J. F., P. K. Grambling and N. M. O'Dell** : Species identification of coagulase-negative staphylococci from urinary tract isolates. J. Clin. Microbiol. 8 : 435~437. 1978.
- Jones, D., R. H. Deibel and C. F. Niven, Jr.** : Identity of *Staphylococcus epidermidis*. J. Bacteriol. 85 : 62~67. 1963.
- Kloos, W. E.** : Natural populations of the genus *Staphylococcus*. Ann. Rev. Microbiol. 34 : 559~592. 1980.
- Kloos, W. E.** : Ecology of human skin. Coagulase-negative staphylococci. Almqvist and Wiksell Int. 37~50. 1986.
- Kloos, W. E. and J. H. Jorgensen** : Manual of clinical microbiology. Staphylococci. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D. C., 143~153. 1985.
- Kloos, W. E. and K. H. Schleifer** : Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. J. Clin. Microbiol. 16 : 509~516. 1975.
- Kloos, W. E. and K. H. Schieifer** : Isolation and characterization of Staphylococci from human skin. II. Description of four new species : *Staphylococcus warnei*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. Int. J. Syst. Bacteriol. 25 : 62~79. 1975.
- Kloos, W. E. and M. S. Musselwhite** : Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on the human skin. Appl. Microbiol. 30 : 381~395.
- Kusuda, R. and A. Sugiyama** : Studies on the characters of *Staphylococcus epidermidis* isolated from diseased - I. On the morphological, biological and biochemical properties. Fish Pathology 16(1) : 15~24. 1981.
- Liekweg, W. G. and L. J. Greenfield** : Vascular prosthetic infections : collected experience and results of treatment. Surgery 81 : 335~342. 1977.
- MacFaddin, J. F.** : Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams and Willikins, Baltimore/Loden. 527pp. 1980.
- Masur, H. and W. D. Johnson** : Prosthetic valve endocarditis. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 80 : 31~37. 1980.
- Mickelsen, P. A., J. J. Plorde, K. P. Gordon, C. Hargiss, J. McClure, F. D. Schoenknecht, F. Condie, F. C. Tenover and L. S. Tompkins** : Insta-

- bility of antibiotic resistance in a strain of *Staphylococcus epidermidis* isolated from an out-break of prosthetic valve endocarditis. *J. Infect. Dis.* **152**, 1 : 50~58. 1982.
- Mortenson, N. and M. Kocur** : Correlation of DNA base composition and acid formation from glucose of staphylococci and micrococci. *Acta Pathol. Scand.* **69** : 445~457. 1967.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards** : Second performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard MZA25. Villanova, Pa : National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1982.
- Parisi, J. T.** : Coagulase-negative staphylococci and epidermiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol. Rev.* **49** : 126~139. 1985.
- Pfaller, M. A. and L. A. Herwaldt** : Laboratory, clinical, and epidermiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**(3) : 281~299. 1988.
- Sanders, R. and G. F. Sheldon** : Septic complication of total parenteral nutrition. *Am. J. Surg.* **132** : 214~219. 1976.
- Schleifer, K. H.** : coagulase-negative staphylococci. Taxonomy of coagulase-negative staphylococci. Almqvist and Wiksell Int. 11~26. 1986.
- Schleifer, K. H. and M. Kocur** : Classification of staphylococci based on chemical and biochemical properties. *Arch. Microbiol.* **93** : 65~85. 1973.
- Schleifer, K. H., and W. E. Kloos** : Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended description of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and description of three new species : *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25** : 50~61. 1975.
- Schoenbaum, S. C., P. Gardner and J. Shillito** : Infection of cerebrospinal fluid shunts, epidermiology, clinical manifestations, and therapy. *J. Infect. Dis.* **131** : 543~552. 1975.
- Shaw, C., J. M. Stitt and S. T. Cowan** : Staphylococci and their classification. *J. Gen. Microbiol.* **5** : 1010~1023. 1951.
- Sneath, P. H. D., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt** : Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Williams & Willikins, Baltimore. 1013~1035. 1986.
- Thatcher, F. S. and W. Simmon** : Some physiological and toxigenic properties of members of the genus *Micrococcus* in relation to taxonomy. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* **5** : 53~60. 1957.
- van Eseltine, W. P.** : On the inadvisability of separating the genera *Micrococcus* and *Staphylococcus*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* **5** : 53~60. 1955.
- Watanakunakorn, C. and C. M. Hamburger** : *Staphylococcus epidermidis* endocarditis complication a Starr-Edwards prosthesis. *Arch. Intern. Med.* **126** : 1014~1020. 1970.
- Willson, P. D.** : Joint replacement. *South. Med. J.* **70** : 55s~60s. 1977.
- Young, L. S.** : Infection in the compromised host. *Hosp. Pract.* **16** : 73~84. 1981.

**The Biological and Biochemical Characteristics of *Staphylococcus epidermidis*
Isolated from Diseased Cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus***

Doo-Saing Sim, Sung-Hee Jung*, Hyung-Sook Park and She-Kyu Chun*****

*Aquaculture Division South Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Agency
Cheon Nam 550-120, Korea*

**Pathology Division National Fisheries Research & Development Agency Kyoung Nam 626-900, Korea*

***Department of Biology Kyungsoong University, Pusan 608-022, Korea*

****Korea Fish Pathology Institute, Pusan 608-022, Korea*

A total of 8 strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated in land-marine tank system of Kyongnam and Kyongbuk. Prefecture were tested for the biological and biochemical characteristics. These strains were isolated from pathologic specimens of cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. Growth of the isolates was good on BHIA, HIA, *Staphylococcus* No. 110 and ETGP. Growth was good at NaCl concentration between 2.0 and 3.0%, about 30°C and at pH values about 7.0. DNase and coagulase production were negative, and all isolates except FSJ-2 strain were positive in hemolysis. Urease was positive reaction, and novobiocin resistance was negative. Acid was produced anaerobically from glucose and maltose. All isolates except FSJ-19 strain produced weakly were negative in anaerobic acid production from mannitol. Acid was produced aerobically from glucose, fructose, galactose, sucrose, maltose and dextrine. But all isolates were not gas production. In characterization of clinically isolates, four different biotype codes were obtained when the all isolated were tested simultaneously. Four different antibiotic susceptibility patterns were obtained.

On the basis of these characteristics, the isolates were identified as *Staphylococcus epidermidis*.

Key Words : *Staphylococcus epidermidis*, coagulase, DNase, β -galactosidase, novobiocin