

균체 지방산 분석을 이용한 *Bacillus anthracis*의 동정

중앙대학교 의과대학 미생물학교실

김원용* · 송태욱 · 송미옥 · 남지연 · 박철민 · 김기정 · 정상인 · 최철순

=Abstract=

Analysis of Cellular Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) for the Identification of *Bacillus anthracis*

Won Yong Kim*, Tae Wook Song, Mi-Ok Song, Ji-Yeon Nam, Chul-Min Park,
Ki-Jung Kim, Sang-In Chung and Chul-Soon Choi

Department of Microbiology Chung-Ang University College of Medicine

Bacillus anthracis, the etiological agent of anthrax has been classified into the *Bacillus* subgroup I with *B. cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* based on morphological and DNA similarity. DNA studies have further indicated that these species have very AT-rich genomes and high homology, indeed it has been proposed that these four sub-species be recognized as members of the one species. Several methods have been developed to obtain good differentiation between these species. However, none of these methods provides the means for an absolutely correct differentiation.

The analysis of fatty acid methyl esters (FAMES) was employed as a quick, simple and reliable method for the identification of 21 *B. anthracis* strains and closely related strains. The most significant differences were found between *B. anthracis* and *B. anthracis* closely related strains in FAMES profiles. All tested strains of *B. anthracis* had a branched fatty acid C17:1 Anteiso A, whereas the fraction of unsaturated fatty acid Iso C17:1 w10c was found in *B. anthracis* closely related strains. By UPGMA clustering analysis of FAMES profiles, all of the tested strains were classified into two clusters defined at Euclidian distance value of 24.5. The tested strains of *B. anthracis* were clustered together including *Bacillus* sp. Kyungjoo 3. However, the isolates of *B. anthracis* closely related spp. Rho, S10A, 11R1, CAU9910, CAU9911, CAU9912 and CAU9913 were clustered with the other group. On the basis of these results, isolates of *B. anthracis* Bongchon, Kyungjoo 1, 2 and *Bacillus* sp. Kyungjoo 3 were reclassified as a *B. anthracis*. It is concluded that FAMES analysis provides a sensitive and reliable method for the identification of *B. anthracis* from closely related taxa.

Key Words: *Bacillus anthracis*, Fatty acid methyl esters (FAMES)

접수 : 2000년 1월 4일, 게재결정 : 2000년 4월 10일

Address for correspondence: 김원용, 156-756, 서울시 동작구 흑석동 221번지 중앙대학교 의과대학 미생물학교실
Tel: (02) 820-5685, Fax: (02) 812-5495, e-mail: kimwy@cau.ac.kr

이 연구는 1998년도 한국학술진흥재단 학술연구조성비 (기초의학: 1998-021-F00159)의 일부로 수행되었음.

서 론

*Bacillus anthracis*는 그람양성 간균으로 아포를 형성하여 토양 및 자연 환경물로부터 인체로 감염되어 탄저를 일으킨다¹¹⁾. *Bacillus* 속균은 ribosomal RNA 염기서열에 의하여 10개의 그룹으로 분류된다^{6,7,28,29,31,33)}. *B. anthracis*는 *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium* 및 *B. mycoides*와 함께 *Bacillus* subgroup I의 대세포 그룹에 속하며¹⁴⁾, 이 균종들은 게놈의 높은 AT 함량²⁴⁾과 높은 유전자 상동성³⁰⁾으로 현재 단일 종으로까지 생각되고 있다³²⁾.

*B. anthracis*는 일반적으로 혐박양성, 비운동성, 비용혈성, penicillin 감수성 및 Triple sugar iron agar에서의 반응과 배양 특성에 의하여 동정 가능하지만 임상검사물로부터 흔히 분리되는 *B. mycoides*와 *B. cereus*는 *B. anthracis*와 유사한 성상을 나타내기 때문에 흔히 *B. anthracis*로 오인된다^{2~4,8,19,20,23)}.

*B. anthracis*는 거대집락 형태의 특성¹²⁾, 단클론 항체를 이용한 특이항원 검출^{12,13)}, 외독소를 암호화하는 pXO1과 pXO2 plasmid의 분리²⁶⁾, PCR, hybridization, Cap 유전자 등의 핵산 분석^{9,24,25)} 등에 의하여 유사 *Bacillus* spp.와 감별·동정 가능하나 이 방법들은 많은 시간이 요구되며 기술의 복잡성 때문에 일반 검사실 동정법으로 이용되기에는 어려움이 있다.

세포지질의 필수 구성 성분으로 모든 미생물에 존재하고 있는 균체 지방산 (fatty acid methyl esters: FAMES)은 10~24개 정도의 carbon chain으로 구성되어 길이, 이중결합의 위치 및 치환기 등에 따라 다양한 형태로 존재하기 때문에 현재 미생물의 화학분류 (chemotaxonomy)에 널리 사용되고 있다. 또한 FAMES 분석은 최근에 MIDI라는 자동화된 gas chromatography를 도입하여 시료에 따른 분석 조건의 표준화, 정확성 및 속도가 크게 향상되었다^{22,34)}.

이 연구에서는 국내에서 분리된 *B. anthracis*와 *Bacillus* subgroup I에 속하는 유사균주들을 대상으로 FAMES 조성을 분석하여 새로운 *B. anthracis* 동정법으로서의 이용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시험균주

본 연구에서 사용한 *B. anthracis*와 *B. anthracis* 유사균주는 총 21주로서 Table 1과 같다. *B. anthracis* 표준균주로는 미국 ATCC와 국립수의과학검역원에서 분양받아 본 교실에서 보존중인 5주를 사용하였다. 국내 분리 *B. anthracis* 균주 중 사람 유래주인 Kyungjoo 1 및 2는 1994년 경북 경주시에서 발생한 환자의 혈액으로부터 분리한 균주를 본 교실에서 동정한 것이며, 동물 유래주인 Bongchon주는 국립수의과학검역원으로부터 분양받았다. *B. anthracis* 유사균주로는 1994년 경북 경주시에서 발생한 환자의 혈액으로부터 분리되어 *B. anthracis*와 유사한 생물학적 성상을 보였으나 동정되지 않았던 Kyungjoo 3주, 서울대학교 보건대학원으로부터 분양받은 Rho, S10A, 11-R1주와 본 교실에서 충남 예산의 토양으로부터 분리한 CAU9910, CAU9911, CAU9912 및 CAU9913주를 사용하였다. 이외에 *Bacillus* subgroup I에 속하는 *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. coagulans*, *B. cereus* 및 *B. thuringiensis*는 생명공학연구소 유전자은행 (KCTC)으로부터 분양받았다.

2. FAMES 분석

1) 시료의 준비

Microbial Identification System (MIS, HP 5890 GC, Microbial ID, Newark, DE, U.S.A.)를 이용한 FAMES 분석은 Miller²⁷⁾의 방법에 따랐다. Nutrient agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.)에서 배양한 약 50 mg의 균체를 Teflon-lined screw cap tube (φ13 × 100 mm, Corning, Inc., Corning, New York, U.S.A.)에 옮긴 후 15%의 NaOH를 첨가한 50% methanol 용액 1 ml를 가하고 100℃에서 30분간 가열한 후 실온에서 냉각하였다. 여기에 2 ml의 methanolic-HCl (6.0 N HCl 325 ml + methanol 275 ml)을 가하여 80℃에서 10분간 가열한 후 급냉하고 1.25 ml의 hexane/methyl-tert-butylether (1:1)을 넣고 10분간 잘 혼합하였다. 반응액은 실온에 정치하여 2개의 층으로 분리시킨 후 하등액을 제거하고 3 ml의 희석 NaOH (10.8 g NaOH/900 ml D.W.)를 첨가하고 5분간 혼합한 다음 포화 NaCl을 몇 방울 가하였다. 상등액의 2/3 정도를 septum-capped sample vial (12 × 32 mm, Alltech Associates,

Table 1. *Bacillus* species used in this study

Species	Strain	Characteristics	Source
Reference strain			
<i>B. anthracis</i>	ATCC 14578	virulent (cap +, tox +)	ATCC
<i>B. anthracis</i>	ATCC 14185	non-virulent (cap -, tox +)	ATCC
<i>B. anthracis</i>	ATCC 14186	non-virulent (cap -, tox +)	ATCC
<i>B. anthracis</i>	Pasteur No. 2 Army	non-virulent (cap -, tox +)	NVRQS
<i>B. anthracis</i>	Sterne 34-F2	non-virulent (cap -, tox +)	NVRQS
<i>B. subtilis</i>	KCTC 1691		KCTC
<i>B. mycoides</i>	KCTC 3453		KCTC
<i>B. coagulans</i>	KCTC 1013		KCTC
<i>B. cereus</i>	KCTC 1014		KCTC
<i>B. thuringiensis</i>	KCTC 3452		KCTC
<i>B. anthracis</i> Isolates			
<i>B. anthracis</i>	Bongchon	Bongchon, China	NVRQS
<i>B. anthracis</i>	Kyungjoo 1	Kyungjoo, Kyungpook	CAU
<i>B. anthracis</i>	Kyungjoo 2	Kyungjoo, Kyungpook	CAU
<i>B. anthracis</i> closely related isolates			
<i>Bacillus</i> sp.	Rho	Shindo Island, Chonnam	SNU
<i>Bacillus</i> sp.	S10A	Shindo Island, Chonnam	SNU
<i>Bacillus</i> sp.	11R-1	Chung-sung-kun, Kangwon	SNU
<i>Bacillus</i> sp.	Kyungjoo 3	Kyungjoo, Kyungpook	CAU
<i>Bacillus</i> sp.	CAU 9910	Yesan, Chungnam	CAU
<i>Bacillus</i> sp.	CAU 9911	Yesan, Chungnam	CAU
<i>Bacillus</i> sp.	CAU 9912	Yesan, Chungnam	CAU
<i>Bacillus</i> sp.	CAU 9913	Yesan, Chungnam	CAU

* ATCC: American Type Culture Collection, U.S.A.; KCTC: Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Korea; VVRQS: National Veterinary Research and Quarantine Service, Korea; SNU: Seoul National University; CAU: Chung-Ang University.

Inc., Deerfield, IL, U.S.A.)로 옮겨 capping하고 분석을 위한 시료로 사용하였다.

2) Gas-liquid chromatography

FAMES의 분석은 Hewlett Packard series II Gas chromatograph model 5890 GC (Microbial ID, Inc., Newark, DE, U.S.A.)를 이용하였으며, separation column은 25 m × 0.22 mm × 0.33 m methyl phenyl silicone fused silica capillary column (HP 19091B-102)을 사용하였다. GC 분석 조건은 carrier로서 H₂ 가스를 사용하고 검출기는 FID detector, 초기 온도

170℃, 최종 270℃, 검출기 300℃ 그리고 Injector 250℃ 등으로 하였다. FAMES profile은 MIS Software (Microbial ID, Inc., Newark, DE, U.S.A.)를 이용하였으며 표준용액과의 비교에 의한 peak의 동정, 저류시간, peak의 면적 및 면적 비율 등을 구하였다. Gas chromatography 조건은 다음과 같다 (carrier gas, hydrogen; column head pressure, 10 psi; split ratio, 100:1; split vent, 50 ml/min; septum purge, 5 ml/min; FID hydrogen, 30 ml/min; FID nitrogen, 30 ml/min; FID air, 400 ml/min; initial temperature,

Table 2. Major cellular fatty acid composition of test groups

Compound	<i>Bacillus anthracis</i> (n=9)				<i>Bacillus anthracis</i> closely related species (n=11)			
	% in test organism				% in test organism			
	Frequency (%)	Mean ^a (%)	Minimum value	Maximum value	Frequency (%)	Mean ^a (%)	Minimum value	Maximum value
Saturated fatty acid								
C14:0	100	1.90	2.32	1.62	100	2.98	4.08	2.33
C15:0	0				9	0.91	0.91	0.91
C16:0	100	3.73	4.82	2.54	100	5.42	8.73	3.98
C18:0	11	1.15	1.5	1.15	0			
Unsaturated fatty acid ^b								
C16:1 w7c alcohol	0				72	1.20	1.77	0.95
C16:1 w11c	0				9	2.37	2.37	2.37
Iso C17:1 w5c	100	4.83	7.29	3.31	100	5.46	8.32	1.91
Iso C17:1 w10c	0				100	4.22	7.06	2.59
Branched fatty acid								
C12:0 Iso	0				27	0.90	1.10	0.71
C13:0 Iso	100	4.85	7.73	3.57	100	7.12	9.33	5.92
C13:0 Anteiso	22	1.21	1.71	0.82	18	1.01	1.05	0.97
C14:0 Iso	100	3.79	6.97	2.60	100	4.56	8.64	2.69
C15:0 Iso	100	38.10	45.93	31.34	100	34.30	40.01	28.59
C15:0 Anteiso	100	6.70	10.34	3.61	100	3.30	5.15	2.38
C16:0 Iso	100	7.34	10.05	5.74	100	7.65	11.88	4.61
C17:0 Iso	100	9.40	12.05	8.05	100	10.81	14.92	8.14
C17:0 Anteiso	100	2.96	4.23	1.68	72	1.42	2.01	0.96
C17:1 Anteiso A	100	2.68	5.15	1.79	0			
Hydroxy fatty acid								
C15:02 OH	0				36	1.17	1.25	0.93
Sum in feature ^c								
3	100	3.86	5.10	2.98	100	3.07	4.48	0.80
4	100	8.90	9.83	7.71	100	7.59	10.07	5.61

^a Mean values were calculated by using FAME data for the test strains, regardless of the fact that every fatty acid was not detected in all of the strains.

^b The position of the double bond can be located by counting from methyl (w) end of the carbon chain. A cis isomer is indicated by the suffix c.

^c Summed features represent groups of two or three fatty acids which could not be separated by gas-liquid chromatography with the MIDI system.

Summed feature 3 contained one more of following fatty acids 12:0 aldehyde. Summed feature 4 contained one more of following fatty acids 16:1 w7c and/or 15:0 iso 2OH.

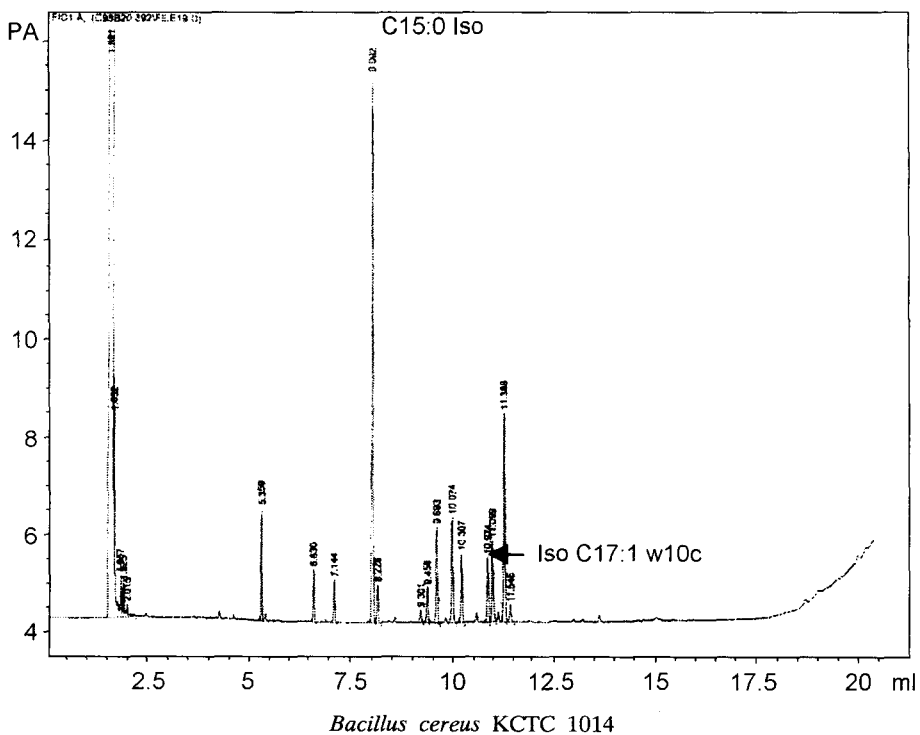
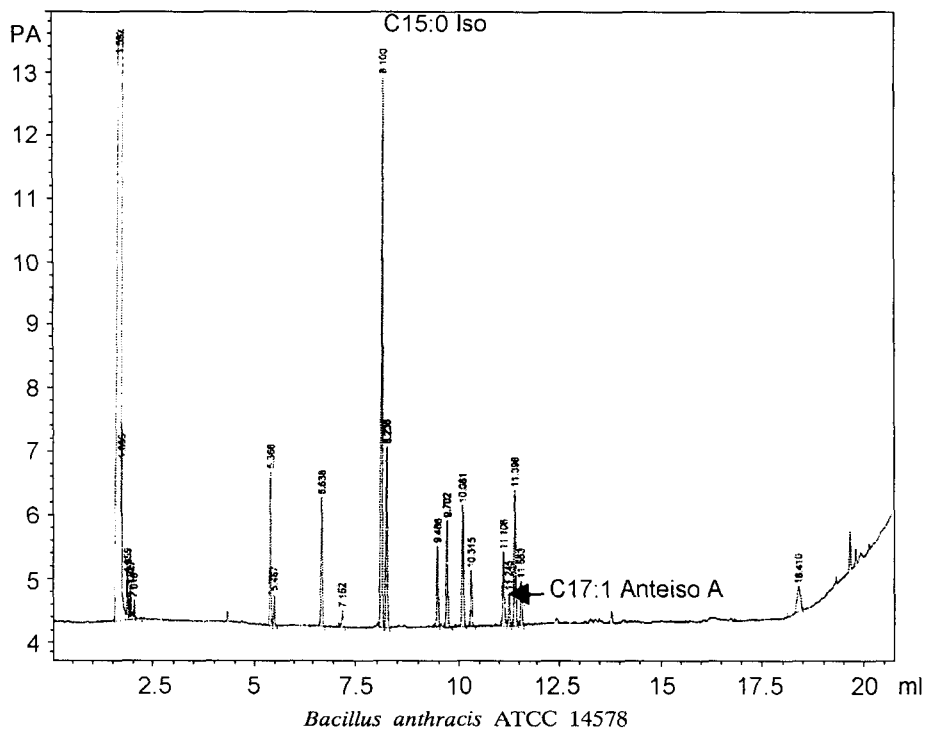


Figure 1. Fatty acid methyl ester profiles of *Bacillus anthracis* ATCC 14578 and *Bacillus cereus* KCTC 1014.

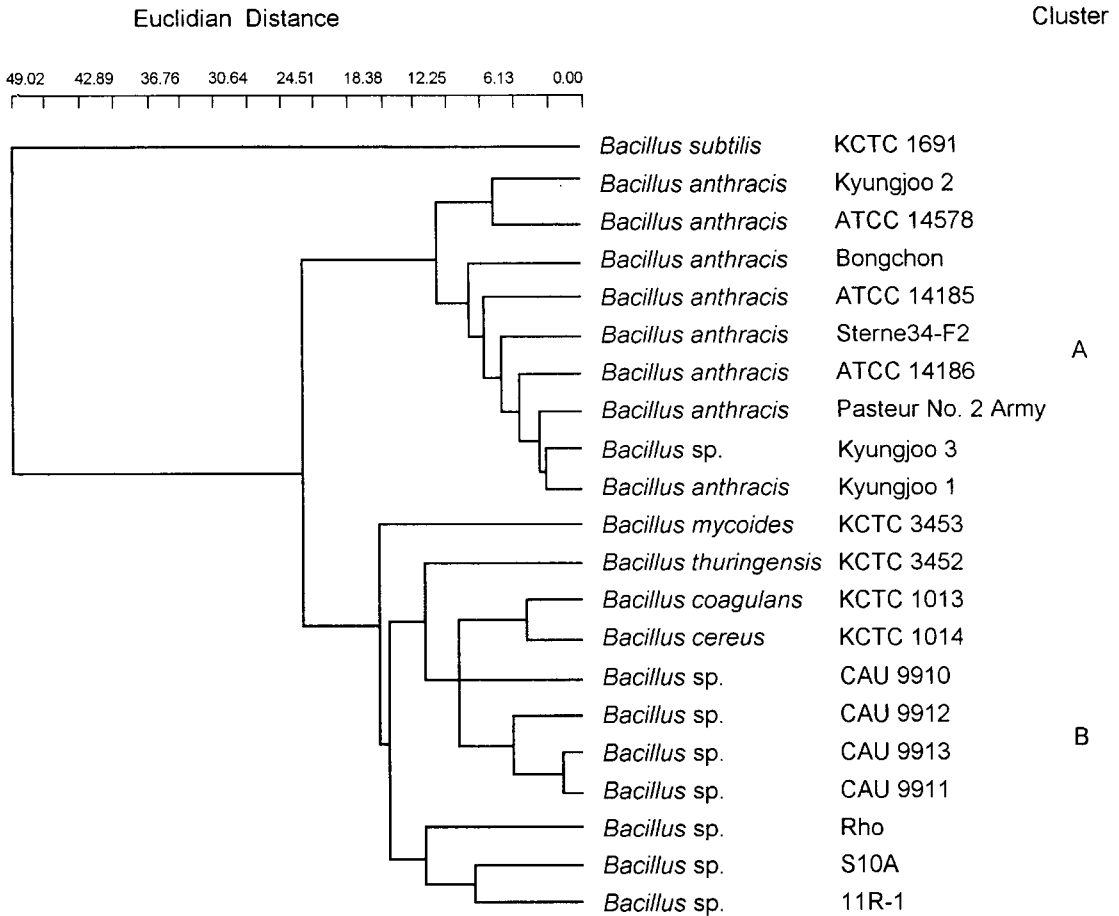


Figure 2. Dendrogram showing the relationship between test strains based on their cellular fatty acid profiles.

170°C; program rate, 5°C/min; final temp, 270°C; FID temperature, 300°C; injection port, 250°C; injection volume, 2 µl).

3) 결과 분석

결과 분석은 Microbial Identification System Aerobe Library (version 3.5, Microbial ID, Inc, Newark, DE, U.S.A.)를 이용하였으며, 모든 실험균주를 대상으로 FAMES 양상의 정량적 분석에 의한 수상도를 구하였다. Clustering 방법은 UPGMA를 이용하였으며 FAMES 양상간의 유사성은 Euclidean distance를 사용하여 계산하였다. Euclidean distance (d)는 $d^2 = \sum (a_i - b_i)^2$ 에 의해 구하였다 (a_i, b_i 는 첫번째 character의 값).

결 과

1. 배양시간이 FAMES 조성에 미치는 영향

5주의 *B. anthracis*와 *Bacillus* subgroup I에 속한 표준균주들을 대상으로 Nutrient agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.)에서 37°C로 각각 24시간과 48시간 배양한 후 FAMES 조성을 비교하였다. 실험 결과 48시간 배양 후의 FAMES 조성에서 24시간 배양 결과보다 높은 재현성을 보여주었다. 따라서 본 실험에서는 모든 균주를 48시간 배양하고 FAMES 조성을 비교하였다.

2. FAMES의 조성

각 균주에 따른 FAMES 조성을 분석한 결과 모든 시험균주에서 총 21종류의 지방산 성분이 검

출되었으며 branched fatty acid인 C15:0 Iso가 주요 성분으로 나타났다. FAMES 조성과 평균 백분율은 Table 2에서와 같았다. *B. anthracis*에서는 총 13종의 지방산이 검출되었으며 모든 시험균주에서 saturated fatty acid인 C14:0, C16:0, unsaturated fatty acid인 Iso17:1 w5c, branched fatty acid인 C13:0 Iso, C14:0 Iso, C15:0 Iso, C15:0 Anteiso, C16:0 Iso, C17:0 Iso, C17:0 Anteiso, C17:1 Anteiso A, summed feature 3 및 4가 검출되었다. 반면 C13:0 Anteiso은 Bongchon주에서, C18:0은 Kyungjoo 2주에서만 검출되었다. *B. anthracis* 유사균주에서는 총 19종류의 지방산이 검출되었다. 시험균주 전체에서 검출된 각 성분은 saturated fatty acid로서 C14:0, C16:0, unsaturated fatty acid로서 Iso17:1 w5c, Iso17:1 w10c, branched fatty acid로서 C13:0 Iso, C14:0 Iso, C15:0 Iso, C15:0 Anteiso, C16:0 Iso, C17:0 Iso, summed feature 3 및 4이었다. 각 그룹간에서 특징적으로 나타난 지방산은 *B. anthracis*에서는 C17:1 Anteiso A, *B. anthracis* 유사균주에서는 Iso C17:1 w10c로 나타났다 (Fig. 1).

3. Euclidean distance와 UPGMA에 의한 cluster

FAMES 조성을 Euclidean distance와 UPGMA에 의하여 분석한 결과 *Bacillus* subgroup I의 대세포균에 속하는 모든 시험균주들은 Euclidean distance 24.5에서 2그룹의 cluster (A, B로 명명)를 형성하였다 (Fig. 2). Cluster A에는 *B. anthracis* 그룹으로 표준균주인 ATCC 14578, ATCC 14185, ATCC 14186, Pasteur No. 2 Army, Sterne 34-F2주와 국내 분리주인 Bongchon, Kyungjoo 1, Kyungjoo 2 및 *Bacillus* sp. Kyungjoo 3주가 속하였다. Cluster B는 *B. anthracis*를 제외한 subgroup I의 대세포균에 속하는 균들로서 *B. mycoides* KCTC 3453, *B. thuringiensis* KCTC 3452, *B. coagulans* KCTC 1013, *B. cereus* KCTC 1014 등의 표준균주들과 분리주인 *Bacillus* spp. Rho, S10A, 11R-1, CAU9910, CAU9911, CAU9912 및 CAU9913이 여기에 속하였다. 대조균으로 사용한 *Bacillus* subgroup I의 소세포균에 속하는 *B. subtilis* KCTC 1691는 독립 cluster를 형성하여 실험의 신뢰성을 보여주었다.

고 찰

미생물을 주관적으로 분류함으로써 발생하는 혼란을 막기 위하여 현대의 미생물학자들은 객관

적인 분류·동정법을 개발하는데 부단한 노력을 해왔다. 이러한 분류 방법은 다상분류학 (polyphasic taxonomy)이란 말로 요약될 수 있으며, 실제적으로 현재 국제적으로 실시되고 있는 모든 미생물의 분류·동정학적 연구는 이러한 개념에 바탕을 두고 있다. 다상분류학은 수치분류 (numerical taxonomy), 화학분류 및 분자분류 (molecular systematics)로 구성되며 화학분류에는 단백질 구성, 세포벽 조성, 지방산, 당, 아미노산, 균체의 finger printing 및 혈청학적 검사 등이 포함된다¹⁵⁾.

현재까지 *B. anthracis*의 분류 및 동정에 대한 연구는 분자분류학적 수준에서 많이 이루어져 왔다. *B. anthracis*는 분류학상으로 가장 근접한 *B. cereus*와 비교할 때 16S rRNA 염기서열의 차이는 없으며 단지 23S rRNA 염기서열에서의 단일 뉴클레오티드 염기의 변화나 삽입만이 다를 뿐이다^{6,7)}. 또한 *B. anthracis* 균주들 사이에서도 16S나 23S rRNA 염기서열의 차이는 관찰되지 않으며¹⁶⁾, 제한효소에 의한 절단형 다형과 random amplified polymorphic DNA에서도 모두 같은 양상을 보인다¹⁷⁾. 그러나 M13 primer를 이용한 arbitrary PCR에서 *vrrA* 유전자상에 존재하는 12 bp의 반복되는 염기서열 (variable number tandem repeat; VNTR)이 발견되었으며⁵⁾, Jackson 등은 *B. anthracis*의 VNTR이 2개에서 6개로 구성됨과 30 kDa 크기의 glutamine 풍부 단백을 지배함을 보고한 바 있다¹⁸⁾. 국내에서도 김 등은 국내 환자 및 토양으로부터 분리된 *B. anthracis*와 유사균주들의 VNTR을 조사하여 국내 분리 *B. anthracis*는 5'-CAATATCAACAA-3' 염기서열을 보이는 4 copy의 VNTR을 가지고 있으나 *B. cereus*는 VNTR이 없음을 보고한 바 있다¹³⁾.

FAMES 분석을 이용한 *B. anthracis*와 *B. cereus*의 감별 동정에 관한 보고는 Lawrence²²⁾ 등이 시험균을 합성 배지인 R 배지에서 성장시켰을 때 지방산의 조성은 동일하였으나 C13:0, C15:0 및 C17:0의 Iso type과 Anteiso type의 각각의 비가 *B. anthracis*에서 보다 *B. cereus*에서 2배 이상 높게 나타나 두 균주의 구별이 가능함을 보고한 바 있다. 이 연구에서는 모든 시험균주에서 나타난 주요 지방산은 C15:0 Iso로서 34.3% 이상의 높은 비율을 보였다. 그러나 Lawrence 등의 보고와는 다르게 특히 지방산으로 *B. anthracis* 그룹에서는 unsaturated fatty acid인 C17:1 Anteiso A와 *B. anthracis* 유사균주 그룹에서는 branched fatty acid인 Iso C17:1 w10c가 검출되어 앞으로 서로 감별 가능한 marker로서 유

용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 이는 Lawrence 등²²⁾의 보고는 자동화된 분석기기인 MIDI가 개발되기 이전의 연구로서 unsaturated fatty acid를 제외한 saturated fatty acid와 branched fatty acid만을 조사하였으며, 분석의 정밀도도 현재보다 떨어졌기 때문으로 생각된다.

FAMEs 조성을 UPGMA로 분석하여 수상도를 작성한 결과 모든 시험균주들은 *B. anthracis* cluster와 *B. anthracis*를 제외한 *Bacillus* subgroup I 대세포 cluster로 분류되었으며 대조균으로 사용한 *Bacillus* subgroup I 소세포 그룹에 속하는 *B. subtilis* KCTC 1691는 독립적인 그룹을 형성하여 실험의 신뢰성이 있음을 알 수 있었다. *B. anthracis* cluster에는 모든 *B. anthracis* 균주들과 1994년 경북 경주시에서 발생한 환자의 혈액으로부터 분리되어 *B. anthracis*와 유사한 성상을 보였으나 생물학적 검사에서 전형적인 *B. anthracis*와는 약간의 차이를 보였던 *Bacillus* sp. Kyungjoo 3가 속하여 이 균주가 *B. anthracis*임을 알 수 있었다. 이 결과는 본 연구 이후에 수행한 총 73가지의 생물학적 특성을 이용한 수치분류학적 결과와도 일치하였다 (data not shown). 다른 *Bacillus* subgroup I cluster에는 서울대학교 보건대학원으로부터 분양받은 *Bacillus* spp. Rho, S10A, 11R-1과 본 교실에서 토양으로부터 분리한 CAU 9910, CAU 9911, CAU 9912 및 CAU 9913이 속하여 이 균들이 *B. anthracis*가 아님을 알 수 있었다. 이는 VNTR¹⁾, 거대집락의 형태를 이용한 동정¹⁾, 주요 배양성상 및 생물학적 성상을 이용한 동정²⁾, 면역확산 시험에 의한 동정³⁾ 및 단클론 항체를 이용한 동정⁴⁾에 의한 기존의 보고와도 일치하였다. 따라서 FAMEs 분석은 *B. anthracis*과 *B. anthracis* 유사균주간의 신속하고 간편한 감별·동정에 유용하게 사용될 수 있다고 생각된다.

결 론

이 연구에서는 *B. anthracis*를 포함하는 *Bacillus* subgroup I 대세포 그룹균들 대상으로 균체의 세포벽에 존재하는 FAMEs 조성을 분석하여 *B. anthracis*의 동정법으로서의 이용 가능성을 조사하고자 하였다.

1. 각 균주에 따른 FAMEs 조성을 분석한 결과 총 21종류의 지방산이 검출되었으며 branched fatty acid인 C15:0 Iso가 주요 성분으로 나타났다. *B.*

*anthracis*에서는 총 13종의 지방산이 검출되었으며 *B. anthracis* 유사균주에서는 총 19종류의 지방산이 검출되었다.

2. 각 그룹간에서 특징적으로 나타난 지방산은 *B. anthracis*에서는 C17:1 Anteiso A, *B. anthracis* 유사균주에서는 Iso C17:1 w10c로 나타났다.

3. FAMEs 조성을 UPGMA clustering 방법에 의하여 분석한 결과 Euclidean distance 24.5에서 *B. anthracis*와 *B. anthracis*를 제외한 *Bacillus* subgroup I 대세포균의 2개의 cluster를 형성하였다. 국내 분리 *B. anthracis* 유사균주에서는 *Bacillus* sp. Kyungjoo 3는 *B. anthracis* cluster에, *Bacillus* spp. Rho, S10A, 11R-1, CAU 9910, CAU 9911, CAU 9912 및 CAU 9913은 *B. anthracis*를 제외한 subgroup I의 대세포균에 속하였다.

이상의 결과로 FAMEs에 의하여 *Bacillus* sp. Kyungjoo 3주는 *B. anthracis*로 확인되었으며 *B. anthracis*과 *B. anthracis* 유사균주간의 신속하고 간편한 감별·동정에 유용하게 사용될 수 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 김원용, 이준명, 송미옥, 남지연, 박철민, 김기정, 정상인, 최철순: variable number tandem repeat 분석을 이용한 한국형 탄저균의 분자진화 및 동정법 개발. *대한미생물학회지* **34**: 311-319, 1999.
- 2) 최철순, 김민희, 정상인, 양용태: 탄저균 병원성 및 약독백신주의 유사 *Bacillus* species로부터 간이 감별을 위한 주요 배양 및 생물학적 성상. *대한미생물학회지* **27**: 93-102, 1992a.
- 3) 최철순, 박정훈, 정상인, 양용태: 탄저균의 협막형 및 비협막형 균주의 전균체항원에 대한 면역혈청을 이용한 Ouchterlony 면역확산 시험에 의한 탄저균 및 유사탄저균의 균종동정과 균주감별. *대한미생물학회지* **27**: 407-417, 1992b.
- 4) 최철순, 장호근, 강석, 김기정, 정상인, 양용태, 박정문, 권준현: 단클론 항체를 이용한 탄저균 (*Bacillus anthracis*)의 동정. *대한미생물학회지* **29**: 535-545, 1994.
- 5) Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH: Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J*

- Bacteriol* **178**: 377-384, 1996.
- 6) Ash C, Collins MD: Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and mimic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol Lett* **94**: 75-80, 1992.
 - 7) Ash C, Farrow JA, Dorsch M, Stackebrandt E, Collins MD: Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of the 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 343-346, 1991.
 - 8) Buchanan TM, Feeley JC, Hayes PS, Brachman PS: Anthrax indirect microhemagglutination test. *J Immunol* **107**: 1631-1636, 1971.
 - 9) Carl M, Hawkins R, Coulson N, Lowe J, Robertson DL, Nelson WM, Titball RW, Woody JR: Detection of spores of *Bacillus anthracis* using the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* **165**: 1145-1148, 1992.
 - 10) Carman JR, Hambleton P, Melling J: *Bacillus anthracis*. In Collins, CF, and Grange, GM (eds) Isolation and identification of microorganisms medical and veterinary importance. Society for Applied Bacteriology. Technical series No. 21, pp. 207-219, Academic press, London, 1985.
 - 11) Choi CS, Lee KW, Chung SI, Yang YT: Differentiation of attenuated vaccine strains, Pasteur no.2-Army and Sterne 34-F2 of *Bacillus anthracis* from other *Bacillus* species by surface and subsurface giant colony morphology. *J Korean Soc Microbiol* **27**: 333-343, 1992.
 - 12) Ezzell JW, Abshire TG: Immunological analysis of cell-associated antigen of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **56**: 349-356, 1988.
 - 13) Ezzell JW, Abshire TG, Little SF, Lidgerding BC, Brown C: Identification of *Bacillus anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall galactose-N-acetylglucosamine polysaccharide. *J Clin Microbiol* **28**: 223-231, 1990.
 - 14) Koneman EW, Allen SD, Janda, WM, Schreckengerger, PC, Winn WC Jr: The aerobic gram-positive bacilli. p 651-664. In color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed. Lippincott, Philadelphia, U.S.A., 1997.
 - 15) Goodfellow M, O'Donnel AC: Roots of bacterial systematics, Handbook of new bacterial systematics, Goodfellow M, O'Donnel AC Eds, pp 3-54, Academic Press, London, 1993.
 - 16) Harrel LJ, Anderson GL, Wilson KH: Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J Clin Microbiol* **10**: 1057-1065, 1995.
 - 17) Henderson I, Duggleby CJ, Turnbull PCB: Differentiation of *Bacillus anthracis* from other *B. cereus* group bacteria with PCR. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 99-105, 1994.
 - 18) Jackson PJ, Richmond KL, Adair DM, Hill KK, Kuske CR, Walthers E, Andersen GL, Wilson KH, Hugh-Jones ME, Kalif AS, Keim P: Characterization of the *vrrA* region that varies in different isolates of *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1400-1405, 1997.
 - 19) Johnson-Winegar A: Comparison of enzyme-linked immunosorbent and indirect hemagglutination assays for determining anthrax antibodies. *J Clin Microbiol* **20**: 357-361, 1984.
 - 20) Kleine-Albers C, Hnoicke E, Hohm R, Pfisterer RM: The detection of antibodies against the protective antigen of *Bacillus anthracis* in infected persons by enzyme-immunoassay (EIA). *Infect Immun* **35**: 235-239, 1994.
 - 21) Lawrence D, Heitefuss S, Seifert HSH: Differentiation of *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* by gas chromatographic whole-cell fatty acid analysis. *J Clin Microbiol* **25**: 1508-1512, 1991.
 - 22) Lee JS, Chun CO, Kim HJ, Joo YJ, Lee, HJ, Park CS, Ahn JS, Park YH, Mheen TI: Analysis of Cellular Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) for the Identification of *Leuconostoc* Strains Isolated from Kimchi. *J Microbiology* **34**: 225-228, 1996.
 - 23) Logan NA, Carman JA, Melling J, Berkeley RC: Identification of *Bacillus anthracis* by API tests. *J Med Microbiol* **20**: 75-85, 1985.
 - 24) MacDonald WC, Felkner IC, Turetsky A, Martey TS: Similarity in base composition of deoxyribonucleates from several strains of *Bacillus anthracis* and *B. cereus*. *J Bacteriol* **85**: 1071-1073, 1963.
 - 25) Makino S, Linuma-Kada Y, Maryyama T, Ezaki

- T, Sasakawa C, Yoshikawa M: Direct detection of *Bacillus anthracis* DNA in animal by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **31**: 547-551, 1993.
- 26) Mikesell P, Ivins BE, Ristoph JD, Dreier TM: Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **39**: 371-376, 1983.
- 27) Miller LT: Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxyacid. *J Clin Microbiol* **16**: 584-586, 1982.
- 28) Nielsen P, Rainey FA, Outtrup FA, Priest FG, Fritze D: Comparative 16S rRNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol Lett* **117**: 61-66, 1994.
- 29) Rainey FA, Fritze D, Stackebrandt E: The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett* **115**: 205-212, 1994.
- 30) Seki T, Chang C, Mikami H, Oshima Y: Deoxyribonucleic acid homology on genus *Bacillus*. *Int J Syst Bacteriol* **28**: 182-189, 1978.
- 31) Shida O, Takgi H, Kadowaki K, Komagata K: Proposal for two new genera, *Brebibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 939-946, 1996.
- 32) Logan NA, Turnbull PCB: *Bacillus* and recently derived genera. p 357-369. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH ed. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1999.
- 33) Wisotzkey JD, Jurshuk P Jr, Fox GE, Deinhard G, Poralla K: Comparative sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 263-269, 1992.
- 34) Yang P, Vauterin L, Vancanneyt M, Swings J, Kersters K: Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* **58**: 3367-373, 1993.
-