

## 지방산분석을 이용한 *Pseudomonas aeruginosa*의 동정

대전성모병원 진단검사의학과

육 근 돌

### Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Using Fatty Acid Analysis

Keun-Dol Yook

Department of Laboratory Medicine, Daejeon St. Mary's Hospital, Daejeon 301-723, Korea

Cellular fatty acid composition of 17 strains of the *Pseudomonas aeruginosa* was determined by gas-liquid chromatography isolated from environmental and clinical sample in a C university hospital. Straight-chain saturated acid of C16:0 and straight-chain unsaturated acid of C18:1 with a double bond were commonly found in all the strains tested. The presence of 12:0 3OH (3-10%), 16:0 (18-28%), and 18:1w7c (17-37%) showed the characteristics of the species in the *Pseudomonas*. Bacterial fatty acid composition was considered to be useful for the study of interrelation and for rapid identification of the bacteria.

**Key Words** : *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, Gas-liquid chromatography, Fatty acid composition

## I. 서 론

세균의 동정은 형태적, 생리-생화학적특성을 기초로 한다. 최근의 화학분류는 세균의 세포조성 즉 염기조성, 세포벽의 분석, 조효소의 분석 등을 사용한다(Guckert 등, 1985).

*Pseudomonas*속의 세균을 분리 동정할 때 생리생화학 적 특성은 유사한 점이 매우 많아 종단위 감별에 어려움이 따른다 (Oberhofer 등, 1977; Otto 등, 1979). 표현형적 특성에 의한 동정방법이 세균 동정에 어려운 이유는 다양한 배지와 시약을 사용해야 되며 세균 동정의 조건이 까다롭고 소요되는 시간이 길며(Kampfer 등, 1989), 동정 과정에서의 주관적 오차가 발생할 확률이 높기 때문에 세균이 가지고 있는 지방산, 다당류, 그리고 단백질 등의

조성성분을 분석하는 화학적 분석법을 이용하는 세균 동정방법이 증가하는 추세이다(Moss, 1981; Huys 등, 1994).

특히 gas-liquid chromatography에 의한 세포 지방산을 측정함으로써 세균의 세포벽을 구성하는 지질을 분석하여 동정하는 방법이 많이 사용되고 있다(Miller, 1982). 지방산 분석은 다른 방법에 비해 간단하고 신속 정확한 방법이다. 또한 동정에 필요한 시약의 구입이 용이하고 저렴할 뿐만 아니라 소량의 균으로 동정이 가능하다. 세균의 지방산은 많은 표현형적 특성과 달리 유전적으로 그 세균의 구조와 기능과 역할에 따라 보존된다(Applebaum 등, 1980).

균체 지방산은 세포막을 비롯한 세포내 막성 소기관의 전구체로 모든 생명체에 주요한 성분으로서 세균의 경우, 지방산의 대부분이 세포막을 구성하는 인지질의 아실(acyl)구성체로 이루어져 있다. 이러한 막성 지방산은 생합성 기작에 근거하여 세균 세포막에 공통적으로 존재하는 연지산(palmitic acid), 경지산(stearic acid), hexade-

교신저자 : 육근돌, (우)301-723 대전광역시 중구 대흥동 520-2, 대전성모병원 진단검사의학과  
Tel : 042-220-9619, 011-209-9615  
E-mail : yook1090@hanmail.net

canoic acid, octa decanoic acid, cyclopropanic acid, 10-methylhexade-canoic acid 등을 포함하는 직쇄상 지방산 계열과 불포화나 수산기와 같은 치환기를 함유 혹은 함유하지 않는 iso-, anteiso-,  $\omega$ -alicyclic 지방산인 분지상 (branched-chain) 지방산 계열로 나누어진다. 세균의 직쇄상 (straight-chain) 지방산은 공통적으로 생성되는 것으로 세균들을 구분하는 데 한계가 있는 반면, iso-, anteiso-, 계열의 분지상 지방산은 세균에서 다양한 형태를 나타내어 세균 분류에 매우 유용한 특성으로 이용되고 있다 (Oyaizu 등, 1983).

이에 본 연구는 *P. aeruginosa* 균주를 분리하여 표현형적 특성조사 및 지방산 분석 방법을 이용하여 세균을 동정 하고자하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 환경 및 임상검체로부터 분리한 C대학병원균주 16균주와 *Pseudomonas aeru-*

**Table 1.** *P. aeruginosa* strains used this study

Strains	Source of area
<i>P. aeruginosa</i> C1	Patient (GS)
<i>P. aeruginosa</i> C2	Patient (GS)
<i>P. aeruginosa</i> C3	Floor (GS)
<i>P. aeruginosa</i> C4	Patient (ICU)
<i>P. aeruginosa</i> C5	Patient (ICU)
<i>P. aeruginosa</i> C6	Patient (ICU)
<i>P. aeruginosa</i> C7	Toilet (ICU)
<i>P. aeruginosa</i> C8	Corridor (ICU)
<i>P. aeruginosa</i> C9	Patient (CS)
<i>P. aeruginosa</i> C10	Patient (CS)
<i>P. aeruginosa</i> C11	Floor (CS)
<i>P. aeruginosa</i> C12	Patient (PED)
<i>P. aeruginosa</i> C13	Patient (ICU)
<i>P. aeruginosa</i> C14	Patient (NS)
<i>P. aeruginosa</i> C15	Floor (NS)
<i>P. aeruginosa</i> C16	Patient (ICU)
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC10145T

GS, general surgery; ICU, intensive care unit; CS, chest surgery; Ped, pediatrics; NS, neurosurgery; T, type strain; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville.

*ginosa* ATCC10145 표준균주 1균주를 포함해서 총 17균주를 사용하였다.

### 2. 미생물 자동화 동정기기에 의한 동정

생화학적 특성조사는 미생물자동화 동정기기인 ATB expression system(bioMerieux Inc. Duham, NC, USA)을 이용하여 시험하였다. Trypticase soy 한천배지에서 생성된 집락을 백금이를 사용하여 McFarland 탁도관 No. 0.5 표준농도로 조절하여 ID32GN 동정 키트에 접종하고 35℃에서 배양 후 결과를 ATB reader을 이용하여 동정하였다.

### 3. 균체의 지방산 분석

균체 지방산 분석을 위해 균체는 Trypticase soy 한천배지에 접종하여 35℃에서 24시간 배양하였다. 균체를 집균(40 mg)후 나사마개 시험관에 넣고 saponification 시약(NaOH 45 g, MtOH 150 ml, 증류수 150 ml) 1 ml을 가하여 진탕한 후, 100℃ 항온수조에서 5분간 반응시킨 다음 다시 진탕한 후 100℃ 항온수조에서 25분간 반응시킨 후 methylation 시약(6N HCl 325 ml, MtOH 275 ml)을 2 ml 가하여 진탕한 후 80℃ water bath에서 10분간 반응시킨다.

반응 후 extention 시약(hexane 200 ml, methyl- tert buthyl ether 200 ml), 1.25 ml를 가하여 실온에서 10분간 진탕시키고 상층액을 다른 시험관에 옮겨 base washing 시약(NaOH 10.8 g, 증류수 500 ml)을 첨가하여 5분간 진탕시켜 상층액을 취하여 gas-liquid chromatography에서 지방산을 분석하였다(Fig. 1).

## III. 결 과

### 1. 분리균주의 생리·생화학적 특성

분리된 16개 균주는 산화효소 양성, catalase 양성, 용혈성시험 양성, 42℃에서 증식으로 나타났고, ID32GN 동정 키트를 사용하여 *P. aeruginosa* 균주로 확인되었다.

### 2. 지방산 분석

본 실험에서 측정된 분리 균주들의 지방산 조성을 보

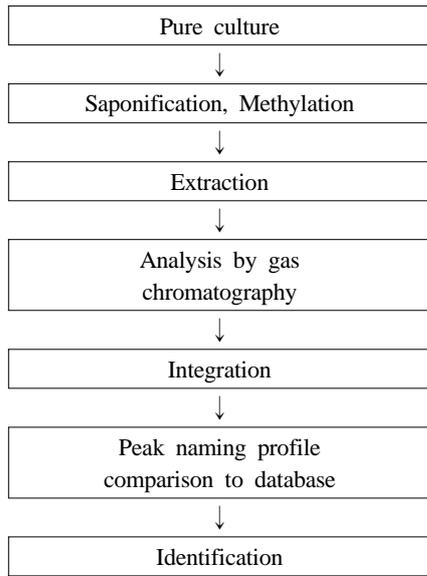


Fig. 1. Gas chromatography analysis of microbial fatty acids.

면 포화 지방산으로는 hexadecanoic acid(16:0)로 18~28%의 범위로 나타났으며, 불포화 지방산은 cis-9-octadecanoic acid는 17-37%를 함유하는 것으로 나타나 실험한 모든 분리균주의 주요 지방산은 16:0, 18:1w7c로 서로 유사한 양상을 나타냈고, 분리균주들과 표준균주들은 동일한 지방산을 가지고 있어, 지방산 조성이 종의 수준에서 일치하는 결과를 보였다(Table 2).

#### IV. 고 찰

*Pseudomonas aeruginosa* 균주는 호기성 그람음성 비발효성 간균으로 병원환경을 비롯하여 자연계에 널리 존재하며 오염된 의료장비나 의료진의 손에 의해서 인체감염을 일으키는 균으로 1990년대부터 원내감염의 원인균으로 급격한 증가를 보이고 있다. 인체감염은 하부호흡기 감염이 가장 흔하고, 비뇨기 감염, 창상감염 및 패혈증 등 다양한 감염증을 유발한다(Clark 등, 1984). 본 실험은 C 대학병원의 환경 및 임상검체에서 분리한 16균주의 *P. aeruginosa* 세균과 표준균주인 *P. aeruginosa* ATCC 10145균주를 대상으로 생리·생화학적 특성을 조사하고 화학분류학적방법인 지방산 분석을 하여 종 동정을 시도하였다.

본 실험에 사용한 분리균주 16개 균주는 산화효소 양성, catalase 양성, 용혈성시험 양성, 42°C에서 증식으로 나타났고, ID32GN 동정 키트를 사용하여 *P. aeruginosa*

Table 2. Cellular fatty acid composition of the *Pseudomonas aeruginosa*

Strains	10:0 3OH	12:0	12:0 2OH	12:0 3OH	16:0	18:1w7c
C1	6	4	7	6	24	31
C2	3	3	5	4	26	37
C3	9	8	12	10	18	17
C4	4	4	6	5	24	36
C5	4	3	5	4	25	36
C6	5	3	4	4	28	33
C7	3	3	5	5	26	33
C8	4	4	5	5	24	34
C9	5	3	4	5	27	37
C10	4	3	3	4	26	37
C11	5	4	5	6	28	33
C12	4	3	4	4	28	36
C13	4	4	5	5	26	31
C14	4	4	5	4	26	34
C15	4	3	5	4	26	35
C16	5	5	6	5	25	31
<i>P. aeruginosa</i> ATCC10145	3	3	5	3	26	36

10:0 3OH, 3-hydroxy acid of 10 carbon; 12:0, 12 carbon; 12:0 2OH, 2-hydroxy acid of 12 carbon; 12:0 3OH, 3-hydroxy acid of 12 carbon; 16:0, 16 carbon; 18:1w7c, cis-7-octadecanoic acid. The number refers to the percentage of an acid to a total acid.

방산으로는 hexadecanoic acid(16:0)로 18-28%의 범위로 나타났으며, 불포화 지방산은 C18:1w7c로 17-37%를 함유하는 것으로 나타나 실험된 모든 분리균주의 주요 지방산은 12:0 3OH, 16:0와 18:1w7c로 서로 유사한 양상을 나타냈고, 분리균주들과 표준균주들은 동일한 지방산을 가지고 있어, 지방산 조성이 종의 수준에서 일치하는 결과를 보였다. *Pseudomonas*속 세균과 근연한 *Alcaligenes*속의 지방산 조사에 관한 연구와 비교한 결과(Kampfer 등, 1989), *Pseudomonas*속의 주요 지방산은 12:0, 16:0와 18:1w7C으로 밝혀져 16:0의 경우, *Pseudomonas*속과 *Alcaligenes*속에서 공통적인 주요 지방산이나, 18:w7c의 경우는 *Alcaligenes*속 세균에서는 전혀 검출되지 않는 *Pseudomonas*속의 특징적인 지방산이며, 한편 iso 17:0w9c 및 17:0 anteiso 등은 *Alcaligenes* 속 세균의 특징적인 지방산으로써, *Pseudomonas*속 세균에서는 전혀 검출되지 않기 때문에 이들 두 속간에 명확한 구별이 가능

하였다.

*Pseudomonas*속 세균의 동정에 있어서 표현형 및 지방산분석에 의한 종의 동정에 용이하나 앞으로 분자유전학적 방법을 이용하면 정확한 세균 동정, 역학 추적 및 생태학적 연구 등에 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

C 대학병원의 환경 및 임상검체에서 분리한 *P. aeruginosa* 16균주와 표준균주인 *P. aeruginosa* ATCC 10145 균주를 가스액체크로마토그래피를 이용해서 지방산분석을 실시하였다.

지방산 분석결과, 시험에 사용된 모든 균주가 직쇄포화 지방산인 C16:0과 이중결합을 지닌 불포화지방산인 C18:1를 함유하고 있었다. 분리균주의 주요 지방산으로는 12:0 3OH(3-10%), 16:0 (18-28%), 18:1w7c (17-37%)를 함유하여 종의 특성을 나타내었다.

본 연구 결과, 지방산분석이 종간의 연관관계의 규명과 신속한 종 동정에 유용한 도구임이 판명되었다.

## 참 고 문 헌

1. Applebaum PC, Stavitz J, Bentz MS. Four methods for identification of gram-negative nonfermenting rods: organisms more commonly encountered in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 12:271-278, 1980.
2. Clark WA, Hollis DG, Weaver RE, Riley P. Identification of unusual pathogenic gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria. *Centers for Disease Control, Atlanta*, 1984.
3. Guckert JB, Antworth CP, Nichols PD, White DC. Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuaries sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 31:147-158, 1985.
4. Huys GM, Vancanneyt R, Coopman P, Janssen E, Falsen M, Kersters K. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Bacteriol* 44:651-658, 1994.
5. Kampfer P, Dott W. Evaluation of the Titertek-NF system for identification of gram-negative nonfermentative and oxidase-positive fermentative bacteria. *J Clin Microbiol* 27:1201-1205, 1989.
6. Miller LT. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl ester, including hydroxy acids. *J Clin Microbiol* 16:584-586, 1982.
7. Moss CW. Gas-liquid chromatography as an analytical tool in microbiology. *J Chromatogr* 203:337-347, 1981.
8. Oberhofer TR, Rowen JW, Cunningham GF. Characterization and identification of gram-negative, nonfermentative bacteria. *J Clin Microbiol* 5:208-220, 1977.
9. Otto LA, Blachman U. Nonfermentative bacilli: evaluation of three systems for identification. *J Clin Microbiol* 10:147-154, 1979.
10. Oyaizu H, Komagata K. Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *J Gen Appl Microbiol* 29:17-40, 1983.