

돼지 由來 *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*의 Bacteriocin(Staphylococcin)型別

朴 清 圭
慶北大學校 獸醫科大學
(1992년 7월 10일 접수)

Bacteriocin (Staphylococcin) typing of swine strains of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*

Cheong-kyu Park
College of veterinary Medicine, Kyungpook National University
(Received July 10, 1992)

Abstract : A total of 113 *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*; which had been isolated from healthy and diseased pigs were examined for their ability to produce staphylococcins. For selection of staphylococcin indicator strains, 80 strains were randomly selected from 113 strains, and were tested as indicator and as donator. The 8 indicators were chosen and used to type all of the strains.

The ability to produce staphylococcin could be demonstrated in 43 strains(38.1%) of 113 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*. The frequency of activity was higher in diseased pig strains(44.4%) than in healthy pig strains(36.8%). 43 staphylococcin producer strains were differentiated into 10 reaction types.

The inhibitory effects of the staphylococcin (N27 and R 3) on other staphylococci differed by the staphylococcal species tested. All the gram-negative species were completely resistant to the three producing strains.

Key words : *Staphylococcus hyicus*, staphylococcin, swine.

緒 論

Staph hyicus subsp. *hyicus*는 哺乳中인 仔豚에서 滲出性 表皮炎(exudative epidermitis)의 原因菌으로 작용하지만 때로는 敗血症, 多發性關節炎 등에도 관여하고 있음이 알려져 있다. 1~4 또한 이 菌은 소^{5~7}, 닭^{8~10}, 개^{11,12} 그리고 고양이^{13,14}에서도 흔히 分離됨이 報告되고 있다.

Bacteriocin은 各種 미생물이 산생하는 抗菌性物質로서 抗生劑와는 달리 이 物質은 同種 또는 近緣의 菌種에 대하여 阻止作用을 나타내는 특징이 있다. Bacteriocin 型別은 *Pseudomonas aeruginosa*^{15~18}, *Klebsiella*^{19,20}, *Proteus*²¹ 그리고 *Serratia marcescens*^{22,23} 感染의 疫學的 追究에 유용한 수단으로 사용되고 있다.

Staphylococci의 bacteriocin에 대해서는 1946년 Fredericq staphylococci에 의해 산생된 發育抑制物質과 co-

licin의 사이에 유사성을 기술하고 이 物質을 staphylococcin이라 命名하였다.²⁴ 그 후 Parker와 Simmons²⁵, Hsu와 Wiseman²⁶, Gagliano와 Hinsdill²⁷ 그리고 Jones와 Edwards²⁸는 staphylococcin이 bacillus, corynebacterium, streptococcus 그리고 clostridium에 대해서도 發育抑制作用이 있음을 報告한 바 있으며 지금까지 *Staph aureus*의 staphylococcin산생 및 특성에 관해서는 다소의 研究報告^{29~31}가 있으나 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*에 있어 이에 관해서는 거의 알려져 있지 않은 실정이다.

이 研究에서는 돼지로부터 分離된 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylococcin 산생빈도를 조사하고 나아가 staphylococcin 產生株에 대해서는 이 菌의 分類를 위한 새로운 方法으로 staphylococcin型別을 試圖하였다.

材料 및 方法

供試菌株 : 총 113株의 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*를 공시하였다. 이들 菌株中 95株는 健康豚의 피부로부터 分離하였고 나머지 18株는 滲出性表皮炎 發症仔豚으로부터 分離하였다.

Staph hyicus subsp. *hyicus*의 供試된 葡萄球菌 및 Gram陰性桿菌은 젖소 乳房炎의 乳汁로부터 分離되었다.

Staphylococci 產生能 檢査 : Brain heart infusion agar(BHIA, Difco)平板培地上에서 획선도말법으로 檢査하였다. 즉, brain heart infusion broth(BHIB, Difco)에서 37°C 18시간 배양한 可檢菌株의 배양액 1白金耳를 BHIA平板培地の 중앙에 직선으로 도말하여 37°C에서 24시간 배양한후 發育菌을 slide glass와 면봉을 사용하여 제거하고 petri dish 뚜껑에 chloroform을 3ml정도 가하여 培地面을 거꾸로 두어 20분간 처리함으로써 잔류균을 살멸시켰다. Chloroform을 완전 증발시킨 다음 菌發育線과 직각이 되도록 BHIB에서 37°C 18시간 배양한 指示菌의 菌液 1白金耳를 교차도말하고 다시 37°C에서 24시간 배양한후 指示菌의 發育有無를 보아 判定하였다.

Staphylococci 型別을 위한 指示菌의 選拔 : 供試菌中 임의로 80株를 選拔하여 위의 方法에 따라 staphylococci 產生能 檢査를 실시하였다. 이들 各菌株는 可檢菌으로서 그리고 동시에 指示菌으로 사용되었다. 可檢菌株中 staphylococci 產生 31株의 指示菌들에 대한 阻止結果를 정리 분석하여 staphylococci 產生株의 阻止樣相을 명확히 區別지게 하는 指示菌 8株를 選拔할 수 있었고, 이들 8株의 指示菌이 본 실험에 供試된 全菌株의 st-

aphylococci 產生과 型別에 사용되었다.

Staphylococci 型別 : 위의 staphylococci 產生能 檢査법에서와 같이 1枚의 BHIA 平板培地에 可檢菌을 4cm의 간격을 두고 平行되게 2직선으로 도말 배양한후 發育菌을 제거하고 chloroform으로 殘留菌을 살멸시켰다. 여기에 BHIB에서 37°C 18시간 배양한 8株의 指示菌液 1白金耳를 1직선상에 4株씩 교차도말하여 배양한후 指示菌의 감수성 양상에 따라 staphylococci 型을 결정하였다.

結 果

可檢菌株의 staphylococci 產生能和 型別을 위한 指示菌을 얻기위해 供試菌中 임의로 80株를 選拔하여 각각 서로를 可檢菌과 指示菌으로 사용하여 시험한 결과 staphylococci 產生能을 충분히 증명할 수 있고 또한 型別을 가능하게 하는 8株의 指示菌을 選拔할 수 있었다. 이들 指示菌은 相互阻止作用의 전개 양상으로 보아(Table 1) 各己 서로 다른 菌株로 인식되었고 自己菌에 대해서는 阻止作用을 나타내지 않았다. 菌株 111과 N32는 staphylococci 非產生株였다.

8株의 指示菌을 사용하여 滲出性表皮炎 發症仔豚과 健康豚의 피부로부터 分離된 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylococci 產生能을 보면 Table 2에서와 같다. 分離菌 총 113株中 43株가 staphylococci를 산생하여 38.1%의 산생양성율을 보였다. 分離源에 따른 산생율은 發症仔豚 由來株에서 44.4% 그리고 健康豚 由來株에서 36.8%의 양성율을 보이고 있어 發症仔豚에서 분리된 菌株가 다소 높은 산생율을 나타내었다.

Table 1. Mutual inhibition of 8 staphylococci indicator strains

| Donor strains | Indicator strains | | | | | | | |
|---------------|-------------------|-----|----|-----|-----|----|----|-----|
| | 111 | M16 | 10 | N32 | N27 | A4 | 52 | R30 |
| 111 | — ^a | — | — | — | — | — | — | — |
| M16 | + | — | — | — | + | + | + | + |
| 10 | + | + | — | — | + | + | + | + |
| N32 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| N27 | + | + | + | + | — | + | + | + |
| A4 | + | + | + | + | + | — | + | + |
| 52 | + | + | + | + | + | + | — | + |
| R30 | + | + | + | + | + | + | + | — |

Symbols : + =inhibition of the strain by the staphylococci ;
— =no inhibition.

Table 2. Staphylococci production and source of 113 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*

| Source | No. of strains examined | No. of positive | Positive rate(%) |
|--------------|-------------------------|-----------------|------------------|
| Healthy pig | 95 | 35 | 36.8 |
| Diseased pig | 18 | 8 | 44.4 |
| Total | 113 | 43 | 38.1 |

Table 3. Staphylococcin production patterns of 43 staphylococcin producers of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*

| No. of strains | Indicator strains | | | | | | | |
|----------------|-------------------|-----|----|-----|-----|----|----|-----|
| | 111 | M16 | 10 | N32 | N27 | A4 | 52 | R30 |
| 15 | +a | - | - | + | + | + | + | + |
| 4 | + | - | + | + | + | + | + | + |
| 10 | + | - | - | - | + | + | + | + |
| 4 | + | + | - | - | + | + | + | + |
| 1 | + | + | + | - | + | + | + | + |
| 1 | + | - | + | - | + | + | + | + |
| 3 | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 1 | + | + | + | + | + | - | + | + |
| 2 | + | + | + | + | + | + | - | + |
| 2 | + | + | + | + | + | + | + | - |

^a Symbols : + =inhibition of the strain by the staphylococcin ;
 - =no inhibition.

Table 4. Inhibition of other *Staphylococci* and Gram-negative rods by 3 staphylococcin producer strains of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*

| Microorganism tested | No. of strains | Staphylococcin producer | | |
|---------------------------|----------------|-------------------------|----|----|
| | | N27 | A4 | R3 |
| <i>Staph aureus</i> | 9 | 9 ^a | 9 | 0 |
| <i>Staph simulance</i> | 2 | 0 | 2 | 0 |
| <i>Staph haemolyticus</i> | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Staph xylosus</i> | 4 | 4 | 4 | 4 |
| <i>E coli</i> | 17 | 0 | 0 | 0 |
| <i>K pneumoniae</i> | 9 | 0 | 0 | 0 |
| <i>E aerogenes</i> | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Ps aeruginosa</i> | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Sal typhimurium</i> | 1 | 0 | 0 | 0 |

^a No. of strains inhibited.

供試菌中 43株의 staphylococcin產生陽性株의 staphylococcin型別分布는 Table 3에서 제시된 바와 같이 指示菌 8株에 대한 阻止양상에 따라 10개의 型으로 분류될 수 있었으며 이들 菌株 모두는 5株以上の 指示菌에 대해 阻止作用을 나타내었다.

대부분의 供試菌이 產生한 staphylococcin은 指示菌에 대해 殺菌의으로 作用하였다. 그러나 staphylococcin N7 과 N27 등은 發育阻止帶의 한계가 불명료하면서 指示菌의 增殖을 阻止시키는 靜菌作用을 나타내었다.

Staph hyicus subsp. *hyicus*가 產生한 staphylococcin의 他 菌種에 대한 發育阻止效果를 보았던 바(Table 4) 葡萄球菌의 여러 菌種에 대해서는 阻止效果를 나타내었으나 供試된 Gram陰性桿菌은 이들에 대해 모두 저항성을 보였다. staphylococcin A4는 공시된 葡萄球菌 모두에 阻止作用을 나타내었으나 staphylococcin R3은 *Staph haemolyticus* 와 *Staph xylosus*에만 阻止作用을 보여 葡萄球菌은 菌種에 따라 staphylococcin에 대한 感受性의 차이가 인정 되었다.

考 察

同一한 菌種의 細菌에 있어서도 어떤 性狀의 차이에 따라 種以下로 까지 분류하여 型別할 수 있다면 이는 疫學的 見地에서 重要한 的의를 갖게 된다. 돼지 滲出性 表皮炎의 原因菌으로 알려진 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylococcin산생빈도와 型別은 아직 確立되어 있지 않다. 본 연구에서 이 菌을 staphylococcin型에 의하여 분류할 목적으로 돼지由來菌株를 사용하여 우선 staphylococcin產生能을 조사하였던 바 38.1%의 菌株가 양성으로 나타났다. 이와같은 결과는 지금까지 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylococcin產生에 관한 他報告가 없어 비교 검토는 할 수 없고 다만 Pulvever 및 Sieg³⁰가 사람과 동물에서 분리한 *Staph aureus*의 50% 菌株가 staphylococcin產生陽性임을 보고한 성적에 비하면 이 菌은 낮은 產生頻도를 보였다 하겠다. 한편 Fink와 Ortel³¹은 *Staph aureus* Oxford 209P株인 단일 指示菌을 사용하여 사람에서 분리한 *Staph aureus*의 4.1% 그리고 *Staph e-*

*pidemidis*의 5.7% 菌株에서 staphylococcin 產生能 이 있음을 보고한 바 있다.

Bacteriocin型은 사용되는 指示菌의 菌數와 方法에 따라 다양하게 나타날 수 있다. 본 연구에서 31株의 staphylococcin 產生株들에 대해 指示菌으로 검사된 80株中 發育阻止效果의 양상에 따라 감수성이 서로 다른 8株를 최종 指示菌으로 선발할 수 있었고, 이들 8株의 指示菌을 사용하여 staphylococcin 產生陽性 43株의 型別을 시도해본 결과 이들 菌은 10개의 型으로 분류할 수 있었다. 위의 結果로 보아 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylococcin 產生에 있어 그 빈도는 비교적 낮은 경향이나 產生陽性株의 菌型은 다양하게 분류할 수 있음을 알 수 있었다.朴 및 康³²은 돼지에서 분리한 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 99% 菌株가 6血清型으로 型別될 수 있었음을 보고한 바 있다. 따라서 이 菌의 staphylococcin 型別은 血清型에 의한 분류방법 등과 병용하여 추구함으로써 同一血清型에서도 다시 세분할 수 있는 疫學的 지표로서의 의의가 있을 것으로 사료된다.

Pulverer와 Sieg³⁰은 *Staph aureus*에서 staphylococcin 產生 陽性菌中 半數以上이 그들이 선발한 12株의 指示菌 가운데 1菌株에 대해서만 阻止作用이 있음을 報告한 바 있으나 본 연구에 공시한 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylococcin은 8指示菌中 5株 또는 그 이상에 대해 阻止效果를 나타냄으로써 作用범위가 보다 廣域性임을 보였다.

Staph hyicus subsp. *hyicus*가 產生한 staphylococcin이 본 연구에 공시된 他種의 葡萄球菌에 대해서도 發育阻止效果를 나타냄을 볼 수 있었다. 그러나 *E coli*를 비롯한 Gram 陰性桿菌에 대한 阻止作用은 인정되지 않았다. 이러한 結果는 Gagliano와 Hinsdill²⁷, Hsu와 Wiseman²⁶ 그리고 Jones와 Edwards 등²⁸이 *Staph aureus*의 bacteriocin에서 報告한 성적과도 一致된 所見이었다.

본 연구에서 비록 공시된 菌數가 적어 정확한 판단은 어렵지만 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*가 產生한 staphylococcin에 대해 葡萄球菌의 감수성이 菌種에 따라 차이가 있음을 관찰할 수 있었다. 葡萄球菌의 全供試菌種이 staphylococcin A4에 대해서는 감수성이었지만 *Staph simulance*는 staphylococcin N27에 의해 그리고 *Staph aureus*와 *Staph simulance*의 全菌株는 staphylococcin R3에 의해 阻止되지 않음을 볼 수 있었는데 葡萄球菌에 있어 菌種에 따라 이들 供試된 staphylococcin의 receptor 부위를 특이적으로 소유하는 유전적 특성이 있는지는 많은 菌株에 대해 더욱 추구함으로써 규명될 수 있으리라 생각된다.

結 論

돼지로부터 分離한 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylococcin 產生빈도를 조사하고 나아가 이 菌의 분류를 위한 방법으로 staphylococcin 型別을 시도하였다. staphylococcin 型別을 위한 指示菌은 可檢菌 80株가 동시에 指示菌으로도 검사되어 이들중에서 감수성이 서로 다른 8株를 선발할 수 있었다.

선발된 指示菌 8株를 사용하여 staphylococcin 產生빈도를 조사한 결과 供試菌 113株中 43株(38.1%)가 陽性 이었고, 이들 菌株의 分離源에 따른 산생율은 健康豚由來株(36.8%)에서 보다 發症豚由來株(44.4%)에서 높았다. Staphylococcin 產生陽性 43株는 10개의 型으로 분류되었다.

Staphylococcin(N27과 R3)의 葡萄球菌屬菌에 대한 阻止效果는 菌種에 따라 차이가 있었고, Gram 陰性桿菌에 대한 阻止作用은 인정되지 않았다.

參 考 文 獻

1. Amtsberg G, Bollwahn W, Harzem S, et al. Bakteriologische, Serologische und Tierexperimentelle Untersuchungen zur Ätiologischen Bedeutung von *Staphylococcus hyicus* beim Nässenden Ekzem des Schweines. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 1973; 80: 493~499, 521~523.
2. 朴清圭, 康炳奎. 돼지 滲出性 表皮炎에 관한 研究 : I. 發症豚 및 健康豚으로부터 *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*의 分離 및 그 性狀. 대한수의학회지 1986; 26: 251~257.
3. Phillips WE, King RE, Kloos WE. Isolation of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from a pig with septic polyarthritis. *Am J Vet Res* 1980; 41: 274~276.
4. Amtsberg G. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese des lokalen und generalisierten Nässenden Ekzems sowie der durch *Staphylococcus hyicus* verursachtem Polyarthritis des Schweine. *Dtsch Tierärztl Wschr* 1978; 85: 433~438.
5. Devniese LA, Keyser HE. Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. *J Dairy Res* 1980; 47: 155~158.
6. Phillips WE, Kloos WE. Identification of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* isolates from veterinary clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 671~673.
7. 朴清圭, 趙鏞煥. 젖소 乳房炎 由來 葡萄球菌에 관한 研究 : II. coagulase 陰性 Staphylococci의 分類

- 및 生化學의 特性. 대한수의학회지 1983 ; 23 : 165~172.
8. Takeuchi S, Kobayashi Y, Morozumi T, et al. Isolation and some properties of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from pigs, chickens and cows. *Jpn J Vet Sci* 1985 ; 47 : 841~843.
 9. Devriese LA, Hajek V, Oeding P, et al. *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* 1978 ; 28 : 482~490.
 10. Devriese LA, Oeding P. Coagulase and heat-resistant nuclease producing *Staphylococcus epidermidis* strains from animals. *J Appl Bact* 1975 ; 39 : 197~207.
 11. Cox HU, Newman SS, Roy AF, et al. Species of *Staphylococcus* isolated from animal infections. *Cornell Vet* 1984 ; 74 : 124~135.
 12. Medleau L, Long RE, Brown J, et al. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. *Am J Vet Res* 1986 ; 47 : 229~231.
 13. Medleau L, Blue JL. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp isolated from feline skin lesions. *JAVMA* 1988 ; 193 : 1080~1081.
 14. Cox HU, Hoskins JD, Newman SS, et al. Distribution of staphylococcal species on clinically healthy cats. *Am J Vet Res* 1985 ; 46 : 1824~1828.
 15. Farmer JJ, III, Herman LG. Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1974 ; 130 : 43~46.
 16. Fyfe JAM, Harris G, Govan JRW. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1984 ; 20 : 47~50.
 17. Cillies RR, Govan JRW. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocine production. *J Pathol Bacteriol* 1966 ; 91 : 339~345.
 18. Jones LF, Zakanycz JP, Thomas ET, et al. Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa* a simplified method. *Appl Microbiol* 1974 ; 27 : 400~406.
 19. Edmondson AS, Cooke EM. The development and assessment of a bacteriocin typing method for *Klebsiella*. *J Hyg, Camb* 1979 ; 82 : 207~223.
 20. Hall FA. Bacteriocine typing of *Klebsiella* spp. *J Clin Path* 1971 ; 24 : 712~716.
 21. Cradock-Watson JE. The production of bacteriocines by *Proteus* species. *Zentralbl Bakteriell Parasitenk Infektionskr Hyg Abt Orig* 1965 ; 196 : 385~388.
 22. Farmer JJ, III. Epidemiological differentiation of *Serratia marcescens* : Typing by bacteriocin production. *Appl Microbiol* 1972 ; 23 : 218~225.
 23. Traub WH, Raymond EA, Startzman TS. Bacteriocin (marcescin) typing of clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol* 1971 ; 21 : 837~840.
 24. Reeves P. The bacteriocins. *Bacteriol Rev* 1965 ; 29 : 25~45.
 25. Parker MT, Simmons LE. The inhibition of *Corynebacterium diphtheriae* and other Gram-positive organisms by *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 1959 ; 21 : 457~476.
 26. Hsu CY, Wiseman GM. Antibacterial substances from *Staphylococci*. *Can J Microbiol* 1967 ; 13 : 947~955.
 27. Gagliano VJ, Hinsdill RD. Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. *J Bact* 1970 ; 104 : 117~125.
 28. Jones GW, Edwards SJ. Examination of an antibiotic produced by coagulase-negative staphylococci isolated from the bovine udder. *J Dairy Res* 1966 ; 33 : 271~277.
 29. Barrow GI. Microbial antagonism by *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 1963 ; 31 : 471~481.
 30. Pulverer G, Sieg JF. Bacteriocinotypie bei *Staphylococcus aureus*. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig* 1972 ; 222 : 446~458.
 31. Fink H, Ortel S. Untersuchungen über Staphylococcins : I. Isolierung Staphylococcinbildender Stämme, Herkunft, Lysisbild und Antibiotikaresistenz. *Zel Bakt I Abt Orig* 1969 ; 211~39~47.
 32. 朴清圭, 康炳奎. 돼지 滲出性 表皮炎에 관한 研究 : II. 돼지 由來 *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*의 血清型別. 대한수의학회지 1987 ; 27 : 47~52.