

Crocin 添加培地에서의 牛乳房炎由來 Streptococcus 의 色素形成에 관한 研究

石 瑚 峰 金 東 成

金 相 烈 李 澤 柱

農村振興廳 家畜衛生研究所

忠北大學 畜產學科

緒 論

材料 및 方法

連鎖球菌은 自然界에 널리 分布되어 사람에게 있어서는 產褥熱을 비롯하여 上部氣道, 腸管, 臍 등에 炎症을 일으키며 動物에는 말의 腺疫, 소의 乳房炎 등에 關連되어 중요한 細菌으로 그간 많은 學者^{1-4,6,7)}의 研究에 의하여 여러가지 血清學的 및 生化學的方法으로 分類된다.

乳房炎由來 連鎖球菌은 주로 *Str. agalactiae* (B群), *Str. dysgalactiae* (C群) 및 *Str. uberis* (E群)가 대부분이고 기타 *Str. pyogenes* (A群), *Str. faecalis* (D群) 등도 包含되어 血清學的으로 뚜렷이 밝혀져 있다. 그러나 培地에 어떤 成分을 添加하여 區別하는 方法은 처음 Edwards²⁾가 crystal violet(0.1%)와 aesculin 添加 血液培地에서 發育集落에 따라 乳房炎由來連鎖球菌을 區別하였고 그후 Edwards³⁾ Allen⁴⁾은 sodium azide를, Rantasalo¹²⁾는 thallium salts를 加한 選擇培地를 使用하여 分離培養을 한층 용이하게 하였다.

李 및 孫¹⁰⁾은 *Fuctose gardeniae*(梔子) 열매의 可溶性抽出液을 含有한 結核培地에서 자란 結核菌에 암자색의 色素를 나타내는 現象을 관찰하여 어떤 抗結核劑에 대한 研究로 시도한바 있으며 最近 崔 등¹¹⁾은 *Fuctose gardeniae*의 主成分인 crocin 色素培地에서 非典型結核菌은 色素變化에 따라 分類하고 이 crocin 還元作用은 結核菌에서 나온 어떤 효소와 연관이 있을 것이라고 추측하였다.

石 및 李⁹⁾는 1975년 乳房炎由來 連鎖球菌을 Lancefield 血清群으로 分類하고 이에 대한 抗生物質의 感受性を 調査한바 있어 우연한 기회에 이 分類된 菌에 crocin 色素變化를 관찰하다가 몇가지 흥미로운 試驗結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

使用菌株: 標準菌으로는 *Str. agalactiae*(ATCC 9925: B群) *Str. dysgalactiae* (ATCC 9926: C群), *Str. uberis*(ATCC 9927: E群) 및 *Str. faecalis* (ATCC10541: D群) 각 1株씩을 日本 東京大學校 醫學研究所에서 분양받아 實驗室에서 諸性狀을 확인한후 血液培地에 塗沫하여 5°C에 보관하면서 試驗에 使用하였다. 本試驗에 使用한 菌주 78株는 젖소 乳房炎 유증에서 分離되었으며 菌分離方法 및 同定은 前報⁹⁾에 기술한 바와 같다.

粗 gardenia (crocin) 粉末의 製造: gardenia 열매를 市場에서 사서 껍질을 벗기고 黃色 열매만 乾造시켜 잘게 捰은후 二重 gauze에 걸러 粉末을 만들었다. 粉末을 80°C에 1시간 정도 말려서 使用時까지는 메시케이트에 保管하였다. 이때 粗粉末의 色素濃度는 抽出 色素를 蒸溜水에 녹여 1ml 당 1mg 含有되게 한 溶液을 Shimadzu Multipurpose Recording Spectrophotometer (Model MPS-50 L)로서 測定하여 440 m에서 最大吸光度를 나타낸다.

使用培地 및 培驗: 試驗에 使用한 培地는 合成培地(Difco)로써 nutrient agar (NA), brain heart infusion agar (BHA), tryptic soy agar (TSA), tryptose phosphate agar (TPA), tryptose blood agar base (TBA), azide blood agar base (ABA) 및 dextrose-agar (DA)의 7種을 使用하였다. 培地製造方法은 各培地에 crocin 粉末을 넣고 100°C에 30分間 끓여 녹지 않는 찌꺼기는 잠시 靜置시키면 가라앉기 때문에 上澄液만을 다시 15 Lb에 15分間 捰균하였다. 培地의 色素形成을 觀察하기 위하여 잘 자란 菌을 斜面이나 平板培地에 均一하게 심어서 37°C에 24時間, 48時間, 72時間씩 관찰하고 色素形成의 淸정은 -, ±, 1+, 2+, 3+로 表記하였다.

Table 1. Pigmentation of Streptococcal Strains on B.H.A. Medium Containing Various Amount of "Gardenia" Powder.

Crocin powder (mg/ml)	Strains Days of Cult.	<i>Str. agalactiae</i>			<i>Str. dysgalactiae</i>			<i>Str. uberis</i>			<i>Str. facalis</i>		
		(ATCC : 9925)			(ATCC : 9926)			(ATCC : 9927)			(ATCC : 10541)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0.00		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.25		—	—	±	—	—	—	—	—	±	—	—	—
0.50		±	±	1+	—	—	—	±	±	1+	—	±	±
1.00		±	1+	1+	—	—	—	1+	1+	2+	±	1+	1+
1.75		1+	2+	2+	—	—	—	1+	2+	2+	1+	2+	2+
2.50		1+	2+	3+	—	—	—	1+	2+	3+	1+	2+	3+
5.00		2+	3+	3+	—	—	—	2+	3+	3+	2+	3+	3+
7.50		2+	3+	3+	—	—	—	2+	3+	3+	2+	3+	3+
10.00		2+	3+	3+	—	—	—	2+	3+	3+	2+	3+	3+

*3+ strongly positive, 2+ moderate positive, 1+ weak positive
± partial or duobtful, — negative.

結 果

Gardenia 粉末의 適正濃度 : 이 實驗은 連鎖球菌의 培地에 crocin 含量에 따른 適正濃度를 調査하기 위하여 ATCC 標準菌株 4 株를 crocin 粉末이 0.25, 0.50, 1.00, 1.75, 2.50, 5.00, 7.50 및 10.00 mg/ml 를 각각 添加한 brain heart infusion agar 에 培養하여 37°C 에 3日間 培養한 成績은 第 1 表와 같다.

第 1 表에서와 같이 crocin 含量이 0.25 mg/ml 에서는 色素形成이 나타나지 않았다가 0.5 mg/ml 이상일 경우에서 *Str. agalactiae*, *Str. uberis* 및 *Str. facalis* 모두 만족할만한 色素變化(2+~3+)를 보였으나 *Str. dysgalactiae* 는 전혀 變化를 일으키지 않았다.

培地種類에 따른 色素形成比較 : 連鎖球菌이 잘 자랄 수 있는 7個培地에 crocin 適定濃度 5.0 mg/ml 를 동일하게 添加한 후 각 ATCC 균주를 培養하여 3日間 色素變化를 調査한 結果 第 2 表와 같다.

第 2 表에서와 같이 *Str. agalactiae* 와 *Str. facalis* 는 BHA, NA, TSA, TBA 및 ABA 培地에서 강한 素形色成 (3+)을 보였으며 *Str. dysgalactiae* 는 第 1 表의 경우와 같이 어떤 培地에서도 色素形成 (-)를 일으키지 않았다. *Str. uberis* 는 BHA 와 TBA 에서 역시 강한 色素形成 (3+)을 보였다. DA 와 TPA 培地는 일반적으로 crocin 色素變化에 영향을 주지 못했으나 BHA 培地는 강한 變化를 주었다.

국내 分離菌의 crocin 培地에 色素形成 : crocin 適

正濃度인 5.0 mg/ml 를 含有한 BHA 培地上에서 國內 乳房炎에서 分離한 連鎖球菌 78 株를 37°C 에서 3日間 培養한 成績은 第 3 表와 같다.

分離菌 78 株는 1975年 乳房炎에서 分離하여 Lancefield 血清反應과 生物學的 性狀으로 同定한 菌株이다. 第 3 表에서와 같이 *Str. uberis* 와 D型菌은 전부 crocin 培地에 色素形成을 보인 반면 *Str. dysgalactiae* 는 第 1 表와 第 2 表에서의 ATCC 標準菌株과 같이 色素形成을 보이지 않았다. *Str. agalactiae* 는 20 株 (74.1%)가 色素形成을 나타내었고 기타균은 色素形成에 特異성이 없었다.

이 成績을 ATCC 標準菌株와 比較하면 *Str. uberis* 및 D型菌과 *dysgalactiae* 는 一致하나 *Str. agalactiae* 에서 약간(7株)의 차이를 보였다.

考 察

連鎖球菌은 一般的으로 血清學的方法和 生物學的方法으로 分類하고있다.

乳房炎由來 連鎖球菌의 Lancefield 血清群은 B, C, E 群이 가장 많고 기타 A, D, G, L, 群은 드물게 報告^{4,58)}하고 있으며 이들은 細胞膜 構成分인 C 多糖體 抗原으로 沈降反應에 의하여 群特異性多糖體를 區別하므로써 分類하고 있다.

生物學的 分類는 주로 生化學的 性狀에 따라 溶血性, 抵抗力, 馬尿酸과 aesculin 加水分解, 糖分解試驗 등으로 확인하고 또 選擇培地上的 發育狀態에 따라 區別하

Table 2. Comparison of Streptococcal Pigmentation on Various Enrichment Media Containing "Gardenia" Powder (5.0 mg/ml).

Strains	Lanc. sero group	Pigmentation of Media after 72 Hours						
		NA	BHA	TSA	TPA	TBA	ABA	DA
<i>Str. agalactiae</i> (ATCC : 9925)	B	3+	3+	3+	2+	3+	3+	—
<i>Str. dysgalactiae</i> (ATCC : 9926)	C	—	—	—	—	—	—	—
<i>Str. uberis</i> (ATCC : 9927)	E/Neg.*	1+	3+	1+	—	2+	1+	—
<i>Str. facalis</i> (ATCC : 10541)	D	3+	3+	3+	—	3+	3+	—

* Extracts of some strains of *Str. uberis* react with Group E antisera but do not induce Group E antibodies in rabbits.

Table 3. Pigmentation on B.H.A. Crocin Medium (5.0 mg/ml) of 78 Streptococci Isolated from Bovine Mastitis

Organisms*	Lancefield Serogroup	Number of Strains tested	Pigmentation on Crocin Media after 72Hours.		
			Positive	Negative	%
<i>Str. agalactiae</i>	B	27	20	7	74.1
<i>Str. dysgalactiae</i>	C	13	0	13	0.0
<i>Str. uberis</i>	E	26	26	0	100.0
Group-A Strep. (<i>Str. pyogenes</i>)	A	4	2	2	50.0
Group-D Strep.	D	1	1	0	100.0
Group-G Strep.	G	3	1	2	33.3
Not identified Streptococci		4	3	1	75.0
Total		78	53	25	67.9

* Organisms are identified by Lancefield serological reaction and other biological properties (Korean J. Vet. Res. Vol. 15 No. 1 (1975)).

고 있다. 選擇培地의 使用은 菌을 分離同定하는데 時間的 節約과 편리한 方法으로 널리 이용된다.

選擇培地는 先人들에 의하여 많이 研究되어 왔으나 Edwards^{2,3)}의 crystal violet와 0.1% aesculin과 0.01% sodium azide를 Rantasalo¹²⁾는 crystal violet와 0.3% thallium salts를 添加한 血液培地에서 連鎖球菌의 集落을 調査하므로써 葡萄球菌과 大腸菌을 區別하였고 *Str. agalactiae*을 주로 選擇할 수 있다고 報告하였다.

李 및 孫¹⁰⁾은 gardenia 掘出液을 添加한 Ogawa 培地에서 結核菌이 暗紫色을 나타내는 것을 觀察하였고 崔 등¹¹⁾은 crocin 含量을 2.8 mg/ml로 添加한 L-J 結核培地上에서 非正型結核菌을 分類한바 있다.

連鎖球菌에 대한 crocin 色素反應은 結核菌과 비슷한 暗紫色을 보였다. 이 試驗에서 crocin 色素(mg/ml)의 吸光度가 A440=0.710이 適定濃度로 봤을때 培地 含量이 5.0 mg/ml일때 crocin 反應이 가장 좋았고 非典型結核菌의 2.8 mg/ml보다 높은 crocin 含量을 要求하고 있다.

또 7個合成培地가 ATCC 連鎖球菌에 대하여 crocin 反應이 가장 좋은 것은 brain heart infusion agar 이었다. dextrose agar에서도 菌의 發育은 良好하나 전혀 crocin 反應을 나타내지 않았고 tryptose phosphate agar는 *Str. uberis*와 *Str. facalis*에 대하여 反應을 보이지 않았다. 이것은 dextrose의 過量(1%)이나 水素 이온 濃度差에서 crocin 反應이 抑制가 된 것이 아

닌가 추측한다.

첫소에서分離되어血清反應과生物學的性狀에 의하여分離同定된 78株의 crocin 反應結果 *Str. uberis* 와 D群은 ATCC 菌과 같이 陽性反應을 나타내었고 *Str. dysgalactiae* 는 陰性反應을 보여 分明히 區別할 수 있었다. 그러나 *Str. agalactiae* 는 74.1%만이 陽性反應을 나타내었으며 ATCC 菌株과 完全히 一致하지 않았다. 이것은 菌을 長期保存하는 동안 菌의 活力이 떨어진 것으로 보나 앞으로 供試菌을 많이 해서 研究하여야 할 문제로 생각한다.

一般的으로 gardenia 粉末을 添加한 BHA 培地에서 時間이 經過함에 따라 열은 紫色에서 暗紫色으로 變하며 처음에는 細菌이 자란 곳에서 나타났다가 다음에는 菌이 자란 培地周圍로 퍼져 全體培地에까지 영향을 미치고 있다. 이것은 崔등¹¹⁾이 암시한 바와 같이 細菌自體의 外毒素나 酵素와 連關이 있는 것으로 추측한다.

先人들¹²⁾의 研究業績에 의하면 病原性 連鎖球菌은 hemolysin, erythrogenic toxin, streptokinase, DN-Aase, proteinase, DPNase, 및 hyaluronidase 같은 物質을 가지고 있으며 一般的으로 A群과 C 및 G群은 서로 비슷한 性質의 外毒素를 가지고 있다고 하였다. 그렇다면 이 試驗結果에서와 같이 같은 性質인 *Str. pyogenes* 와 *Str. dysgalactiae* 및 G群은 crocin 反應을 阻止할 수 있을 것이며 性質이 다른 B, D 및 E 群은 增加시킬 수도 있을 것이다. 이런 문제는 앞으로 外毒素나 酵素試驗으로 뒷받침이 되어야 할 것이다.

이상의 成績으로 乳房炎由來 連鎖球菌을 crocin 添加培地에서 色素形成에 따라 *Str. dysgalactiae* 와 *Str. uberis* 및 D群의 區別이 可能하며 Edwards 培地나 thallium salts 培地 (*Str. agalactiae* 分離培地)와 같이 使用한다면 血清學的方法보다 손쉽게 菌을 分離同定할 수 있을 것으로 思料된다.

結 論

Crocin 을 添加한 培地에서 乳房炎由來連鎖球菌의 色素形成을 비교 관찰하였다.

crocin 添加量이 5.0 mg/ml 일때 BHA 培地에서 가장 좋은 crocin 反應을 보였고 *Str. uberis* 와 D群 (*Str. facalis*) 連鎖球菌은 暗紫色의 色素形成을 보여 色素形成을 일으키지 않는 *Str. dysgalactiae* 와 區別할 수 있었다. 또한 *Str. agalactiae* 도 거의 대부분이 色素形成을 일으켰으나 crocin 反應에 特異성이 없는 것도 있었다.

謝辭: 本研究에 至大한 關心과 後援을 해주신 李昌九 所長께 그리고 本實驗을 잘 끝내도록 積極 討議해 주신 서울大學校 獸醫科大學 全允成教授께 감사드립니다.

參 考 文 獻

1. Allen, P.R.: A selective medium for the diagnosis of streptococci. J. Bact. (1943) 46 : 343.
2. Edwards, S.J.: Studies on bovine mastitis. A selective medium for the diagnosis of streptococcus mastitis. J. Comp. Path. Ther. (1933) 46 : 211.
3. Edwards, S. J.: The diagnosis of streptococcus mastitis by cultural methods. J. Comp. Path. Ther. (1938) 51 : 250.
4. Miller, W.T. and Heishman, J.O.: Bovine mastitis caused by unusual types of streptococci. Cornell Vet. (1940) 111 : 310.
5. National Mastitis Council: Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis. University of New Hampshire Press. (1969) p. 4.
6. Ochi, Y., Ogata, M. Kanoe: Studies on streptococci. I. On classification of streptococci. Jap. J. Vet. Sci. (1960) 22 : 353.
7. Stanetz, L.W. and Naghski, J.: Studies on streptococci of bovine mastitis. J. Inf. Dis. (1940) 66 : 80.
8. Wilson, G.S. and Miles, A.A.: Principles of bacteriology, virology and immunity. 6ed., Great Britain by Butler & Tanner Ltd. London (1975) p. 712.
9. 石瑚峰, 李鉉洙: Lancefield grouping 에 의한 乳房炎由來 Streptococcus 의 同定과 抗生物質에 대한 感受性調查. 大韓獸醫學誌 (1975) 15 : 69.
10. 李澤柱, 孫濟英: 植物界로부터 出發한 抗菌素物質에 關한 研究. 第五報: Fructus Gardenia 를 添加한 培地에서의 抗酸性菌의 態度. 中央家畜衛生研究報告 (1955) 3 : 78.
11. 崔喆淳, 金在鶴, 尹用德, 李鉉洙, 李澤柱: Crocin 添加結核培地上的 色素形成에 의한 非正型 Mycobacteria 의 分類. 大韓微生物學會誌 (1974) 9 : 33.

12. Rantasalo, I.: Isolation of streptococci by the use of nutrient media containing thallium

salts. Ann. Med. Intern. Fenn. (1947) 36 : 341.

Studies on Pigmentation of Bovine Mastitic Streptococci Cultured on Crocin Added Media

Ho Bong Seok, D.V.M., M.S. and Dong Sung Kim, D.V.M., Ph.D.

Institute of Veterinary Research, Office of Rural Development

Sang Youl Kim, D.V.M., M.S. and Taik Joo Lee, D.V.M., Ph.D.

Division of Animal Husbandry, Chungbuk College

Abstract

On the basis of pigment production on brain heart infusion agar medium containing crocin, differentiation of mastitic streptococcus was investigated. Intensive crocin reaction was showed in brain heart infusion agar when maximum volume of gardenia powder was 5.0 mg/ml and dark-violet pigmentation of *Str. uberis* and Group D (*Str. faecalis*) Streptococcus were differentiated from negative strains of *Str. dysgalactiae*.

Also, although most of *Str. agalactiae* was produced pigment, a few was not affected with the crocin reaction.