

수영만에서 분리된 *Bacillus cereus* Group LS-1의 세균학적 특성에 관한 연구

성희경* · 이원재¹ · 김용호 · 함근주

인제대학교 부산백병원 임상병리과, ¹부산수산대학교 미생물학과

수영만에서 분리된 *Bacillus cereus* group LS-1의 형태학적, 생화학적 성상 및 지방산 조성 분석을 통하여 세균학적인 특성을 밝혔다. *B. cereus* group LS-1은 면양혈구배지에서 비용혈성의 점조성 집락과 convex하고 가장자리가 규칙적인 등근형태로 운동성이 없고 glucose, maltose, sucrose와 gelatin을 이용하고 trehalose와 salicin을 분해하지 않으며 6.5% NaCl에서 자라지 않는 Gram 양성 중성 아포형성간균으로 표준균주 *B. cereus* group과 다소 차이를 나타내었다. 지방산 조성 분석에서 chain의 길이가 C₁₂에서 C₁₇로 iso C₁₅와 iso C₁₃의 branched chain이 우점하는 *B. cereus* group의 전형적인 특징을 나타내었으며 nC₁₅가 검출되지 않는 *B. mycooides* GC subgroup B로 0.312의 similarity index(SI)를 지칭하여 다른 연구결과와도 일치하였다. 한편 API system (API 50 CHB & API 20E)의 ATB computer profile에서 "Doubtful Profile" 99.7%의 *B. firmus*로 나타내어 큰 차이를 나타내었다. 67개의 biochemical characters로 *B. cereus* group 중의 *B. mycooides*(KCTC 1012), *B. thuringiensis*(KCTC 1033), *B. cereus* S-3 그리고 *B. mycooides* S-12는 각각 42%, 42%, 59%와 52%의 similarity matrix를 나타내었다. *B. cereus* group간에 아주 낮은 similarity를 나타내어 상당한 차이가 있음을 인식하였다. 따라서 key test와 지방산 조성 등을 종합해 볼때 *B. cereus* group중의 *B. mycooides*로 새로운 biotype인 것으로 사료되며 지방산 조성 분석으로 동정함이 훨씬 용이하였다.

KEY WORDS □ *Bacillus cereus* group, biotype, API system, fatty acid analysis, identification

Bacillus cereus group은 주로 사람이나 동물에 병 원성을 나타내는 *B. cereus*, *B. anthracis*와 곤충류에 질병원이 되는 *B. thuringiensis* 그 외 *B. mycooides*의 4종으로 되어 있다(7, 8, 32). 이들 세균은 생화학적인 성상이 비슷하여 한때는 *B. anthracis*와는 *B. cereus*의 단일 종으로 언급되어 왔으나 최근 소수의 형태학적(7, 10, 13, 17, 18, 23), 생화학적(19, 20)인 특징을 중심으로 각각의 종들로 분류되어 있고 group내에 각 종별 serotype(22)들이 많이 보고되고 있다. 분류 및 동정에 있어서 유전학적 차원에서도 종간 DNA/DNA homology가 대단히 높아 분류가 어렵고(15), 혈청학적인 방법에서도 특이성이 낮다고 보고하고 있어 Lectin 특이성에 의한 성질로 동정을 시도하기도 하였다(3). 그러나 임상에서 검출되는 것은 질병증상과 몇몇 key test를 중심으로 동정되고 있지만은(16~18, 21) 서식지 환경이 다양한 자연생태계로부터 새로운 미생물을 분리하고 동정한다는 것은 여간 까다로운 일이 아닐 수 없다.

최근 탄수화물 등의 기질 이용능을 보기 위한 상품화된 Packaged system(19, 20), 균체의 지방산 조성(1, 12~14, 25, 27, 28) 그리고 혈청학적(5, 24, 29, 30) 방법(15, 16) 등이 소개되고 있지만 분리균의 성질에 따라서 유효 적절하게 선택되어야 바람직한 결과를

기대할 수 있다.

본 연구에서는 최근 동정에 많이 활용되고 있는 API system과 균체의 지방산조성 분석을 이용하여 수영만 해역에서 분리된 성상이 새로운 *Bacillus cereus* group으로 인정되는 것을 일부 표준균주와 대조하여 세균학적인 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

공시균주는 연안 해역에서 분리된 *Bacillus cereus* group LS-1이며 대조균으로 한국유전공학연구소 유전자은행으로부터 분양받은 *Bacillus mycooides*(KCTC 1012), *Bacillus thuringiensis*(KCTC 1033), *Bacillus sphaericus*(KCTC 1184), 그리고 보관중인 *Bacillus pumilus*(ATCC 7061), 임상과 자연계로부터 분리된 각각의 *Bacillus cereus* S-3와 *Bacillus mycooides* S-12를 사용하였다.

실험방법

형태 및 생화학적 특성

Conventional 방법 : 모든 균주는 면양혈구 배지(녹십자)와 nutrient broth agar(Difco, Detroit, Mick)에서의 성상을 관찰하고 Gram stain하여 형

태학적인 특징을 조사하였다. 생화학적인 특징은 Gordon 등(4, 8, 16, 17, 21)이 제시한 방법으로 실시하였다.

상품화된 kit : API 50 CHB(API bioMérieux sa)와 API 20E(API bioMérieux sa)를 kit system에 따라 조작하였으며 판독은 ATB computer data base version 2.0을 이용하였다.

지방산 분석

추출 : Miller(25)의 방법에 따라 지방산을 추출하였다.

Trypticase soy broth agar(BBL, Cockeyville, Md)에서 28°C, 24시간 배양한 다음 슬러지 약 40 mg을 screw cap tube(13×100 mm)에 넣고 50% methanol~15% NaOH 1 ml를 첨가하여 100°C에서 30분간 끓인다. 가수분해물을 실온으로 식혀 methanolic HCl 2 ml를 첨가하고 80°C에서 10분간 가열하여 메틸화시킨 다음 hexane-methyl-tert-butyl ether(1:1; vol/vol) 1.25 ml를 첨가한다. Fatty acid methyl ester-물질질을 취한 다음 base washing으로 희석 NaOH 3 ml를 첨가하여 상층액을 분석용 vial에 넣어 분석용 시료로 사용하였다.

분석 조건 : Microbial Identification System (MIS : Hewlett-Packard 5890A)으로 fused-silica capillary column(25×0.2 mm)이 부착된 gas liquid chromatography(GLC)를 이용하여 air 40 psi, H₂ 30 psi, N₂ 20 psi의 압력에서 각각 평균속도 400 ml/min, 30 ml/min, 30 ml/min으로 injection temperature 250°C, detection temperature 300°C, oven temperature를 매분 5°C 상승시켜 170°C에서 300°C까지로 하여 FID 검출기로 검출하였다.

분리군의 동정

형 태

생화학적인 동정은 Gordon *et al.*(8), Logan *et al.*(20, 21), Meynell and Lawn(23), Sneath(28, 29), Keneman *et al.*(16), Turnbull and Kramen(33) 등을, 지방산 조성의 분석은 Abel *et al.*(1), Kaneda(12~14), Niskamen *et al.*(27)과 Goodfellow와 Mininikin(9) 등을 참조로 하였다. API system은 ATB computer data base의 similarity %로 나타내었으며, 지방산 조성은 MIS Library entry에서의 similarity index(SI)로 나타내었으며 Sneath와 Sokal(31)의 수리분류에 근거하여 해석을 시도하였다.

결 과

분리군의 형태적, 생화학적 특성

Colony 성장 : 분리군주를 편양혈구 한천배지상에서 35°C, 24시간 동안 5.5% CO₂ incubator에서 배양한 집락은 2~3 mm 크기로 가장자리가 둥글며 회백색의 점조성을 가지고 smooth, convex하며 용혈성은 인식되지 않았다. 같은 조건에서 nutrient broth agar에서도 용혈형을 제외하고서는 같은 성장

을 나타내었다.

세포학적 성상 : Gram 염색결과는 1500X 광학현미경하에서 중심성 또는 아중심성의 내아포를 관찰할 수 있었으며 양성간균으로 염색되었다. 3% carbolfuchsin에서 paracrystal (protein crystal)은 찾아볼 수 없었다.

생화학적인 성상 : API system의 항목과 conventional 방법에서의 생화학적인 특성(Table 1)에서 실시한 탄수화물 이용능은 두 방법간에도 잘 일치하였다. 공시균주는 catalase 양성이며 christensen citrate, glucose, sucrose, maltose와 gelatin을 이용하고 혐기성 조건에서 자라며, pH 6.8 nutrient broth에서 자랄 수 있어 일반적인 *Bacillus cereus* group과 잘 일치하였다. 그러나 trehalose와 salicin을 이용할 수 없었고 6.5% NaCl에서 자랄수 없는 점이 달랐다. 순수 API system(Table 2)에서 표준균주들은 99.9%의 "Excellent Identification"으로 나타났으나, *B. mycoides*(KCTC 1012)는 genus 수준에서 "Good Identification"으로, 임상에서 분리된 *B. cereus*는 98.7%로 "Good Identification"을 지칭하였고 공시균주는 99.7%의 *B. firmus*로 "Doubtful Profile"로 나타났다.

지방산 조성

Chain의 길이가 C₁₂에서 C₁₇ 사이이며 branched chain인 iso-C_n과 anteiso-C_n이 대부분으로 그람양성균에서 볼수 있는 특징을 가지고 있었다(Table 3). 균종별로 보면 *B. mycoides*(KCTC 1012), *B. thuringiensis*(KCTC 1033), 자연계로부터 분리된 *B. mycoides*와 공시균주는 C₁₃에서 C₁₇의 chain 길이를 가지며 iso C₁₅와 iso C₁₃이 주요 구성성분이고 임상에서 분리된 *B. cereus*는 C₁₃에서 C₁₇의 chain을 가지며 주요 구성성분은 *B. cereus* group과 일치하였다. *B. sphaericus*(KCTC 1184)와 *B. pumilus*(ATCC 7061)는 C₁₃에서 C₁₇의 길이를 가지며 각각 iso C₁₅와 iso C₁₆ 그리고 iso C₁₅와 anteiso C₁₅의 순으로 우세하였다.

동 정

API system과 MIS의 결과(Table 2)에서 각 균주를 각각 90% 이상의 similarity와 0.5 이상의 similarity index(SI) 수준에서 잘 일치하고 *B. mycoides*(KCTC 1012)는 *B. cereus* group 수준에서는 받아들여 질 수 있으나 종수준에서는 받아들여 질 수 없었으며 공시균주는 API system에서 Doubtful Profile로 99.7% *B. firmus*의 similarity를 나타내었고 *B. stearothermophilus*에 0.2%의 similarity를 제시하고 있으나 MIS에서는 *B. mycoides* GC subgroup B로 0.312 SI치를 나타내고 있어 system간에 큰 차이를 보였다. Conventional system을 포함하여 67개의 character로 Sneath(1973)의 similarity matrix로 조사해 본 결과 표준균주 *B. mycoides*(KCTC 1012)와 *B. thuringiensis*(KCTC 1033)은 85% 이상, 그 외 *B. cereus* group간에는 42%의 similarity에서 받아들일

Table 1. Characteristics of Biochemical test for each strain

Test	KCTC 1012	KCTC 1033	KCTC 1184	ATCC 7061	S-3	S-12	LS-1
Ortho-nitrophenyl-galactoside	-	-	-	+	--	-	-
Arginine*	+	+	-	+	-	+	-
Lysine*	-	-	+	-	-	-	-
Ornithine*	-	-	+	-	-	-	-
Sodium citrate*	+	+	-	-	+	+	-
Sodium thiosulfate*	-	-	-	-	-	-	-
Urease*	-	-	+	-	-	-	-
Tryptophane desaminase	-	-	-	-	-	-	-
Indole*	-	-	-	-	-	-	-
Sodium pyruvate(VP)*	+	+	+	+	-	+	-
Gelatinase*	+	+	+	+	+	+	+
NO ₃ -NO ₂	+	+	-	-	+	+	+
Glycerol	-	+	-	+	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose*	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	+	-	-	-	-
Ribose	+	+	-	+	+	+	-
D-Xylose*	-	-	+	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol*	-	-	-	-	-	-	-
β-methyl-xylose	-	-	-	-	-	-	-
Galactose*	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose*	+	+	-	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	-	+	+	+	+
D--Mannose*	-	+	-	+	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose*	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol*	-	-	-	-	-	-	-
Inositol*	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol*	-	-	+	-	-	-	-
Sorbitol*	-	-	-	-	-	-	-
α-methyl-D-mannose	-	-	+	-	-	-	-
α-methyl-D-glucose	-	-	+	-	-	-	-
N-acetyl-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+
Amygdailine	-	-	+	-	-	-	-
Arbutine	+	+	-	+	-	+	-
Esculin*	+	+	-	+	-	+	-
Salicin*	+	+	-	+	-	+	-
Cellobiose*	+	+	-	+	-	-	-
Maltose*	+	+	-	+	+	+	+
Lactose*	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Sacchrose(sucrose)*	+	+	-	+	+	+	+
Trehalose*	+	+	-	+	+	+	-
Inuline	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	+	+	-	-	+	-	-
Glycogen	+	+	-	+	-	+	+
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-
β-Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-
D-Turanose	-	-	-	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	+	-	-	-

Table 1. Continued

Test	KCTC 1012	KCTC 1033	KCTC 1184	ATCC 7061	S-3	S-12	LS-1
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-	-	-	-
2-ceto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-
5-ceto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-
Catalase*	+	+	+	+	+	+	+
Growth of pH 6.5 Nutrient broth*	+	+	+	-	+	+	+
Growth of anaerobic condition*	+	+	-	-	+	+	+
Inhibition of 6.5% NaCl*	+	+	+	+	+	+	-
Motility*	+	+	+	+	+	-	-
Hemolysis on sheep blood agar plate*	+	+	+	+	+	-	-

*: conventional method, +: assimilation, -: non assimilation

Table 2. Discrepancies between the API system and the MIS

Strain	System	API system (API 50CHB & API 20E) similarity%	MIS(fatty acid) similarity index
<i>B. mycooides</i> (KCTC 1012)		85% <i>B. cereus</i> 1 14.9% <i>B. mycooides</i>	0.616 <i>B. pasteurii</i> 0.450 <i>B. thuringiensis</i>
<i>B. thuringiensis</i> (KCTC 1033)		99.9% <i>B. thuringiensis</i> 0.1% <i>B. mycooides</i>	0.633 <i>B. thuringiensis</i> 0.574 <i>B. pasteurii</i> 0.474 <i>B. cereus</i>
<i>B. sphaericus</i> (KCTC 1184)		99.9% <i>B. sphaericus</i> 0.1% <i>B. brevis</i>	0.613 <i>B. sphaericus</i>
<i>B. pumilus</i> (ATCC 7061)		99.9% <i>B. pumilus</i> 0.1% <i>B. amyloliquefaciens</i>	0.918 <i>B. pumilus</i>
<i>B. cereus</i> (S-3)		98.7% <i>B. cereus</i> 2 0.7% <i>B. cereus</i> 1	0.608 <i>B. cereus</i> 0.353 <i>B. thuringiensis</i>
<i>B. mycooides</i> (S-12)		99.9% <i>B. mycooides</i> 0.1% <i>B. cereus</i> 1	0.512 <i>B. mycooides</i> GC subgroup B
<i>B. cereus</i> group(LS-1)		"Doubtful profile" 99.7% <i>B. firmus</i> 0.2% <i>B. stearothermophilus</i>	0.312 <i>B. mycooides</i> GC subgroup B

수 있었고 공시균주인 *B. cereus* group LS-1은 *B. cereus*(S-3)와 *B. mycooides*(S-12)에 있어서 50% 이상의 유사도를 나타내나 그 외 *B. cereus* group간에는 40%의 similarity를 나타내었으며 또한 single linkage cluster(Fig. 1)를 작성해 본 결과 단일 계급(rank)을 형성하며 40% similarity 수준에서 *B. cereus* group으로 받아 들일 수 있었다.

고 찰

일반적으로 *Bacillus cereus* group은 면양 혈구 배

지상에서 *B. anthracis*를 제외하고는 녹색색의 집락을 형성하면서 완전 용혈을 일으키는 것으로 알려져 있다(15, 16, 18, 21, 32, 33). *B. mycooides* S-12 와 공시균주 *B. cereus* group LS-1은 전혀 용혈성을 관찰할 수 없었으며 더구나 공시균주는 회백색의 점조성이고 convex, smooth하며 가장자리가 일정한 둥근집락을 나타내어 *B. cereus* group과 큰 차이를 나타내었다. 대부분의 *B. mycooides*는 nutrient broth에서 rhizoid를 형성하는데(16, 21, 32, 33) *B. mycooides* (KCTC 1012)와 공시균주에서는 전혀 관찰할 수 없었으므로 *B. anthracis*와 *B. mycooides* 중에서 변이주가

Table 3. Cellular fatty acid composition(%) of species of *Bacillus*

Strain	Saturated chain																Total	Others
	Unsaturated chain				Branched chain								Straight chain					
	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₃	C ₁₅	Anteiso	odd-iso	Even-iso	Normal	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆				
<i>B. mycoides</i> (KCTC1012)	14.45	8.98	1.38	4.83	1.02	10.05	31.81	7.25	0.76	4.96	6.16	3.33	1.18	3.84	100			
<i>B. thuringiensis</i> (KCTC1033)	15.60	8.49	1.24	4.25	0.73	11.04	34.22	5.57	0.65	4.54	4.48	4.15	0.90	3.78	100			
<i>B. sphaericus</i> (KCTC1184)	12.74	2.56	—	5.86	0.66	—	64.31	3.32	—	2.42	6.80	—	1.34	—	100			
<i>B. pumilus</i> (ATCC7061)	2.62	2.32	—	33.48	5.23	0.69	43.00	5.65	—	0.99	1.57	1.35	—	3.10	100			
<i>B. cereus</i> S-3	9.8	10.05	0.86	3.52	0.82	10.89	42.21	8.74	—	2.40	3.18	2.56	1.07	3.92	100			
<i>B. mycoides</i> S-12	1.89	6.3	1.84	4.40	0.76	14.61	32.72	10.39	0.83	1.85	2.83	4.24	—	7.35	98.66			
<i>B. cereus</i> group LS-1	11.6	4.77	3.98	7.12	0.99	17.68	23.22	10.72	1.46	2.87	3.09	4.17	—	8.32	99.99			

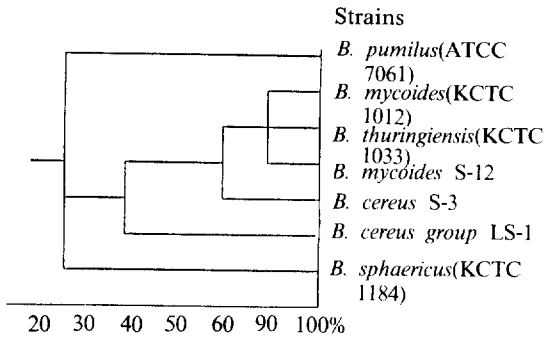


Fig. 1. A dendrogram showing similarity relationships among *Bacillus* strains.

아닌가 사료되나 가장자리가 규칙적인 점이 *B. anthracis*가 아님을 인식할 수 있었다. 점조성을 나타내어 Gram 염색한 결과 Gram 양성이며 중앙부위가 염색되지 않은 아포형성 간균임을 확인할 수 있었고(2, 7, 10) 3% KOH에 점질물을 형성하지 않고 5 μ g vancomycin에 감수성인 있는 것으로 보아 Gram 양성균임을 알 수 있었다(6). 3% carbolfuchsin 염색에서 paracrystal을 관찰할 수 없어 *B. thuringiensis*는 아닌 것을 알 수 있었으며(3, 22, 26). 생화학적 성장에서 sulfide indole motility 배지에서 운동성이 관찰되지 않는 것은 *B. cereus* group의 *B. mycooides*와 *B. anthracis*와 유사했다(20). Conventional 생화학적인 성장에서 glucose, sucrose, maltose 그리고 gelatin을 이용하는 것으로 보아 *B. cereus* group에 속하며 gelatin을 빠르게 분해하는 점은 *B. anthracis*와 달랐다(11, 18, 20). API system (API 50 CHB & API 20E)에서 표준균주와 자연계에서 분리된 일부 균주들은 95% 이상의 유사도로 "Good identification"으로 받아 들여지고 있으나 표준균주 *B. mycooides*(KCTC 1012)는 85% 수준에서 *B. cereus* 1(*B. thuringiensis*), 14% 수준에서 *B. mycooides*로 각각 받아 들여지고 있어 다른 표준균주 99.9%와는 큰 차이를 나타내었고, 공시균주인 *B. cereus* group(LS-1)은 99.7%의 *B. firmus*와 0.2%의 *B. staerothermophilus*로 지칭하여 Library entry에서 "Doubtful Profile"로 나타나고 있지만 공시 균주가 운동성이 없고 mannitol과 esculin을 이용하지 않으므로 *B. firmus*는 아니며 중심성 아포를 형성하는 것으로 보아 역시 *B. staerothermophilus*도 아님을 알 수 있었다(8, 32). 지방산 조성에서 일반 표준균주는 0.5이상의 SI로 first choice에서 잘 일치하고 있으나 표준균주 *B. mycooides*(KCTC 1012)는 MIS에서 second choice 0.45의 SI로 *B. thuringiensis*와 일치하고 API system에서는 14.9%의 *B. mycooides*와는 matching되지 않았으며 first choice에서 0.616 SI의 *B. pasteurii*로 생화학적인 특징에서 V-P양성이고 starch를 이용하며 pH 6.5 nutrient broth에서 자라

므로 *B. pasteurii*라 할 수 없었다(32). 이것은 *B. cereus* group 수준에서는 받아 들여질 수 있으나 다른 분리 균주 *B. mycooides*(S-12)와 공시균주에서 nC₁₅가 검출되지 않았는데 *B. thuringiensis*(KCTC 1033)와 같이 검출되는 점은 표준균주가 *B. mycooides*가 아니고 오히려 *B. thuringiensis*가 아닌가 사료되며 추후 다른 표준균주와의 검토가 요구된다. 공시균주는 0.312의 SI로 *B. mycooides* GC subgroup B로 단독으로 지칭되었는데 최소한 0.5 이상되어야 종수준에서 받아 들여질 수 있다. 그러나 한 종만을 지칭하므로 새로운 종이거나 지칭 균종으로 받아 들일 수 있을 것으로 생각되었고 Kaneda(12~14)의 연구에서도 *B. cereus* group는 chain의 길이가 C₁₂에서 C₁₇이고 iso C₁₅와 iso C₁₃의 순으로 branched chain이 우점한다고 제시한 것과 일치했으며 특히 *B. mycooides*인 경우 nC₁₅가 검출되지 않는 점은 공시 균주와도 일치하였다(9).

그러나 형태학적인 성상이 다른 것은 *B. mycooides*의 변이주가 아닌가 사료되어 conventional 방법과 API system의 67개 character로 Sneath와 Sokal(31)의 similarity matrix로 조사해 본 결과 공시균주는 *B. mycooides*(KCTC 1012), *B. thuringiensis*(KCTC 1033), *B. Sphaericus*(KCTC 1184), *B. pumilus*(ATCC 7061), *B. cereus* S-3 그리고 *B. mycooides* S-12와 각각 42%, 42%, 26%, 24%, 59% 와 52%로 나타내었으며 표준균주 *B. cereus* group간에는 60%의 similarity를 나타내었고 반면 공시균주는 *B. cereus* S-3와 *B. mycooides* S-12를 제외하고는 40% 수준의 similarity를 나타내어 상당한 차이를 관찰할 수 있었다. *B. mycooides*(KCTC 1012)나 *B. mycooides* S-12보다 *B. cereus* S-3에 더 높은 similarity를 나타내고 있는 것이 특징이며 single linkage cluster 형성(Fig. 1)에 있어서 *B. cereus* group간에 40% similarity로 받아 들여지고 있었는데 의외로 *B. pumilus*(ATCC 7061)는 *B. mycooides*(KCTC 1012)와 *B. thuringiensis*(KCTC 1033)와 약 60% similarity를 나타내어 single linkage cluster 형성에 문제점을 인식할 수 있었고 지방산 분석 결과(Table 3)와 상당한 차이가 있었다. 수리분류학상의 해석에 있어서는 더 많은 character와 적절한 character의 선택이 중요한 인자로 작용하므로 다각적인 검토가 필요하며 key test에서 공시균주가 trehalose와 salicin의 이용능이 없고 gelatin의 이용능으로 보면 단순한 biotype보다는 새로운 *Bacillus* species 로 생각할 수도 있어 유전학적인 분류를 고려해 볼 수 있으나 Kaneko 등(15)은 *B. cereus* group간에는 DNA/DNA homology가 대단히 높아 분류가 어렵었다고 하였고, 또한 혈청학적인 측면에서도 비특이적인 반응이 많다고 한다(29, 30). 반면 Abel 등(1)에 의하면 균체의 지방산 조성은 유전학적으로 지배를 받으므로 표준화된 조건에서 plasmid나 minor 변이에 의한 뚜렷한 영향을 받지 않으며 지리적인 여건에 관계없이 주어진 조건에서 분류 및 동정이 용이하다고 한 점을 감안할때 본 연

구에서도 conventional, API system, 지방산 조성과 수리분류를 종합하여 *B. cereus* group 중에서 *B. mycooides* 변이형(biotype)으로 동정 및 분류하는 것이 바람직한 것으로 사료되었다. *B. cereus* group에서는 기존 방법들보다 실질적인 분류 및 동정에 있어서 MIS에서는 복잡한 과정을 거치지 않고 더 정확하게 동정된 것을 알 수 있었고 *B. cereus* group 감별에 있어서 유용한 방법으로 인정되었으며 앞으로 공시 균주가 새로운 biotype *B. mycooides*인지 관한 것은 보다 더 많은 형태학적, 생리 생화학적 또 유전 혈청학적인 포괄적 연구가 따라야 될 것으로 사료된다.

사 사

본 연구를 위하여 협조해 준 부산수산대학교 미생물학과 해양미생물학 교실원 여러분들께 감사를 드린다.

참 고 문 헌

- Abel, K., H. de Schmetzing, and J.I. Peterson, 1963. Classification of microorganism by analysis of chemical composition. I. Flasability of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.* **85**, 1039-1044.
- Avakyan, A.A., L.N. Katz, K.N. Levina, and I.B. Pavlova, 1965. Structure and composition of *Bacillus anthracis* Capsule. *J. Bacteriol.* **90**, 1082-1095.
- Cole, H.B., J.W. Ezzell, K.F. Keller, and K.J. Doyle, 1984. Differentiation of *Bacillus* species by Lectins. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 48-53.
- Cowan, S.T., and K.J. Steel, 1974. Manual for the identification of medical bacterial. 2nd ed. Cambridge University Press, 103-116.
- Ezzell, J.W., T.G. Abshire, S.F. Little, B.G. Lidgerding, and C.Brown, 1990. Identification of *Bacillus anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall galactose-N-acetylucosamine polysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 223-231.
- Finogold, S.M., W.J. Martin, and E.G. Scott, 1982. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 6th ed., C.V. Mosby Co., St. Louis. **25**, 288.
- Gerhardt, P., 1967. *Cyology of Bacillus anthracis*. *Fed-Proc.* **26**, 1504-1517.
- Gordon, R.E., W.C. Haynes, and C.H.N. Pang, 1973. The genus *Bacillus*. handbook No. 427. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Goodfellow, M., and D.E. Minnikin, 1985. Chemical methods in bacteria systematics Academic press. N.Y., 145-171.
- Hachisuka, Y., and S. Kozuka, 1981. A new test of differentiation to *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* based on the existence of spore appendages. *Microbiol. Immunol.* **25**, 1201-1207.
- Harmon, S.M., 1982. New method for differentiating members of the *Bacillus cereus* group. collaborative study, *J. Assoc. off. Anal-chem.* **56**, 1134-1139.
- Kaneda, T., 1967. Fatty acid in the Genus *Bacillus*. I. Iso-and anteiso-Fatty acid as characteristic constituents of Lipids in cospecies. *J. Bacteriol.* **93**, 894-903.
- Kaneda, T., 1968. Fatty acid in the genus *Bacillus*. II. Similarity in the fatty acids compositions of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **95**, 2210-2216.
- Kaneda, T., 1977. Fatty acid of the Genus *Bacillus*. An Example of Branched-chain preference. *B. Review.* **41**, 391-418.
- Kaneko, J, R. Nozaki, and R. Aizawa, 1978. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Immunol.* **22**, 639-641.
- Keneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell, W.H. Jonda, H.M. Sommers, and W.C. Winn, 1988. Diagnostic Microbiology, 3th ed, *J. B. Lippincott Co.*, 355-364.
- Knisely, R.F., 1966. Selective medium for *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **92**, 784-786.
- Knisely, R.F., 1965. Differential media for the identification of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **90**, 1778-1783.
- Logan, N.A., B.J. Capel, J. Melling, and R.C.W. BerKeley, 1979. Distinction between emetic and other strains of *Bacillus cereus* using The API system and numerical Methods. *FEMS Microbiol. Letters.* **5**, 373-375.
- Logan, N.A., J.A. Carman, J. Melling, and R.C. Berheley, 1985. Identification of *Bacillus anthracis* by API tests. *J. Med. Microbiol.* **20**, 75-88.
- MacFaddin, J.F., 1980. Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria, 2nd ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 209-214.
- Martin, P.A.W. and R.S. Travers, 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2437-2442.
- Meynell, G.G., and A.M. Lawn, 1965. Inheritance of Capsule and the Manner of Cell Wall Formation in *Bacillus anthracis*. *J. Gen. Microbiol.* **39**, 423-427.
- Mikami, T., K. Hiraoka, T. Murakani, J. Boon-Long, T. Matsumoto, and M. Suzuki, 1990. Detection of common flagella antigen on *Bacillus cereus* by monoclonal antibody. *Microbiol. Immunol.* **34**, 709-714.
- Miller, L., and T. Berger, 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. *Hewlett-Packard Application.* Note 228-248.
- Montaldi, F.A. and I.L. Roth, 1990. Parasporal Bodies of *Bacillus laterosporus sporangia*. *J. Bacteriol.* **172**, 2168-2171.
- Niskanen, A., T. Kiutamo, S. Raisanen, and M. Raevuori, 1978. Determination of fatty acid composition of *Bacillus cereus* and related

- bacteria: a rapid gas chromatographic method using a glass capillary column. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 453-455.
28. Odonnell, A.G., J.R. Norris, R.C.W. Berkeley, D. Claus, T. Kaneko, N.A. Logan, and R. Nozaki, 1980. Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens* by Pyrolysis Gas Liquid Chromatography, Deoxyribonucleic Acid-Deoxyribonucleic Acid Hybridization, Biochemical Tests and API systems. In: *J. Sys. Bacteriol.* **30**, 448-459.
 29. Phillips, A.P., K.L. Martin, and M.G. Broster, 1983. Differentiation between spores of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* by a Quantitative Immunofluorescence Technique. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 41-47.
 30. Phillips, A.P., and J.W. Ezzell, 1989. Identification of *Bacillus anthracis* by polyclonal antibodies against extracted vegetative cell antigens. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 419-432.
 31. Sneath, P.H., and R.R. Sokal, 1973. Numerical Taxonomy, the principles and practice of numerical classification, W.H. Freeman Co., San Francisco.
 32. Sneath, P.H., 1986. *Bergey's manual of Systematic bacteriology*. Vol. 2. Baltimore. Williams and Wilkins co., 1105-1138.
 33. Turnburn, P.C.B., and J.M. Kramer, 1991. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiol. Washington, D.C., 296-303.
- (Received July 13, 1992)
(Accepted July 31, 1992)

ABSTRACT: Studies on Bacterial Characteristics of *Bacillus cereus* Group LS-1 Isolated from Suyeong Bay.

Seong, Hee Kyung*, Won Jae Lee¹, Yong Ho Kim and Kun Ju Harm
(Department of Clinical Pathology, Pusan Paik Hospital, Inje University, Pusan, Korea, ¹Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Korea)

These studies were carried out to identify *Bacillus cereus* group LS-1 strain isolated from Suyeong Bay. This strain was differentiated from *B. cereus* group using conventional, API system and fatty acid composition analysis. Colony characteristics were opaque, mucoid, entire margin, convex, circular and nonhemolysis on sheep blood agar plates, and were observed with central spore forming positive bacilli in a Gram stained preparation, and had no motility. The carbohydrates tested; glucose, maltose, and sucrose were assimilated but neither trehalose nor salicin were assimilated. This strain utilized gelatin and was also inhibited by 6.5% NaCl. The results of biochemical examination were differentiated from *B. cereus* group LS-1 compared with others *B. cereus* group. The fatty acid composition contained major amounts of branched chain acids, iso C₁₅ and iso C₁₃, and the range of chain length was C₁₂ to C₁₇ and nC₁₅ acid was not detected. Automated fatty acid computer profile indicated "*B. mycoides* GC subgroup B of 0.312 similarity index." The results agreed with other research cases. On the other hand, ATB computer profile index of API system (API 50 CHB & API 20E) identified "Doubtful profile of 99.7% *B. firmus*". These results were presented with considerable discrepancies between API system and fatty acid analysis. With 67 biochemical characters, the similarity matrix of *B. mycoides* (KCTC 1012), *B. thuringiensis* (KCTC 1033), *B. cereus* (S-3) and *B. mycoides* (S-12) showed 42%, 42%, 59%, and 52%, respectively. Through the key tests and fatty acid analyses, we could notice the appearance of *B. mycoides* of the *B. cereus* group and this leads us to suspect the existence of a new biotype *B. mycoides*.