

약수에서 분리한 *Yersinia pseudotuberculosis*의 병원성과 16S rDNA 분석에 의한 분자학적 분류

이영기* · 최성민 · 오수경 · 이강문 · 엽 곤¹

서울시보건환경연구원 미생물검사팀, ¹단국대학교 미생물학과

서울시내 25개 자치구에 산재한 약수터에서 5주의 *Yersinia pseudotuberculosis*를 분리하여 생화학적 특성, 병원성의 유무 및 16S rDNA 분석을 실시하였다. 분리된 *Y. pseudotuberculosis*는 모두 병원성 유전자인 *inv*를 소유하고 있었으며, 16S rDNA를 증폭한 후 염기서열을 분석하여 NCBI Genbank에 등록된 다른 *Yersinia* 속 및 장내세균 등과 비교해 본 결과 *Yersinia* 속 등과는 97.5%에서 100%의 높은 상동성(Similarity)을 나타내었고, 다른 장내세균 등과는 93.0%에서 95.1%의 낮은 상동성을 나타내었다. 16S rDNA 염기서열을 기초로 계통수를 작성한 결과 크게 3개의 cluster를 형성하였는데 특히 *Y. enterocolitica* (Z49830)은 *Y. pseudotuberculosis* (Z21939)와의 상동성(97.7%)보다 *Y. intermedia* (X75279)와의 상동성(97.9%)이 더 높게 나타났으며, *E. coli* (Z83205)는 *Proteus vulgaris* (AJ233425)와의 상동성(93.2%)보다 *Salmonella enteritidis* (U90318)와의 상동성(97.7%)이 더 밀접한 연관성을 나타내었다.

Key words □ *inv*, phylogenetic tree, similarity, *Yersinia pseudotuberculosis*, 16S rDNA,

Genus *Yersinia*는 Family Enterobacteriaceae에 속하는 통성 혐기성, 그람음성 간균으로 균체의 표현형과 DNA 상동성에 의하여 11개종과 3주의 미동정 균주로 구성된다(3,5,14). 이 중에서 병원성을 나타내는 것은 *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*로서 특히 *Y. pseudotuberculosis*는 사람의 소화기계로 감염되어 발열, 설사 및 복부통을 수반하는 위장염을 특징으로 하는 패혈증 질환, 신장질환 및 급성 장간막 림프절염 등을 일으킨다(1,10,13,22). *Y. pseudotuberculosis*는 serogroups O1부터 O8까지 분리 되어 왔으며 최근에는 O9, O10, O11, O12, O13, O14와 O1c가 새롭게 추가 되었고 이 중에서 O1c와 O7, O9, O11, O12, O13, O14는 비병원성 균주로 간주되고 있다(21).

*Y. pseudotuberculosis*는 애완동물, 농장동물, 야생동물, 토양, 담수 등에 널리 분포하고 있지만 사람으로의 전이감염 양식과 다양한 지역에서의 미생물학적 유전적 관계 등에 대한 역학적 조사는 충분하지 않다(3,13). 그러나 설치류나 새같은 야생동물이 carrier나 natural reservoir로 추정되고 있으며 사람과 동물은 이러한 동물과 직접 접촉하거나 이런 동물의 분비물에 의해 오염된 음식이나 음용수의 섭취에 의해 감염된다(1,12,22).

*Y. pseudotuberculosis*에 대한 연구는 유럽과 일본에서 특히 많은데 일본에서 주로 발생하는 임상 병원균은 산악지역에 거주하면서 처리되지 않은 음용수를 마신 가족에게서 종종 발견된다. 일본에서 최초의 *Y. pseudotuberculosis* 감염은 1977년에 14건이 발생하였는데 주로 혈청형 1b, 2c, 3, 4b 그리고 5a가 대부분으로 아직까지 1a와 4a는 보고된 적이 없다(16).

전통적으로 미생물의 분류에는 형태학이나 생화학적 특성, 혈청학적 특성 및 DNA-DNA 유사성에 바탕을 두고 있으나 최근 미생물의 계통분류에 관하여 유전형질의 유연성 및 진화적 개념을 도입한 ribosomal RNA를 중심으로 활발한 연구가 진행되고 있다. rRNA는 세포질 무계의 대부분을 차지하며 단백질 합성의 중요 요소로서 유전적 요소가 보존적이어서 다양한 생물의 비교 연구가 가능하여 현재 생물간의 진화적 계통관계를 확립하는데 유용하게 사용되고 있다(8,14,20). 특히 16S rRNA 유전자는 미생물의 체계 및 계통 유전학적 관계를 규명하는 분자생물학적 연구에 광범위하게 사용되고 있는 실정이다(4,5,7,8,14,15).

본 연구에서는 약수에서 분리된 *Y. pseudotuberculosis*의 병원성을 알아보고 아울러 16S rDNA 분석에 의한 간편하고 신속한 분자학적 분류 및 동정법을 개발하여 앞으로 *Yersinia* 속균들간에 적용 가능한지를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험균주

1999년 5월부터 6월까지 서울시 25개 자치구내의 약수터에서 채취한 약수를 대상으로 균 분리를 시도하여 *Y. pseudotuberculosis* 5주를 분리해 내었으며 대조균주는 *Y. pseudotuberculosis* ATCC 6902를 사용하였다.

실험균의 분리 및 동정

Ewing (9)의 방법과 Bergey's manual of systemic bacteriology (17)에 따라 각종 생화학 시험을 실시하였고 추가로 시판용인 API 20 E kits를 사용하여 *Y. pseudotuberculosis*로 최종 확인·동

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-570-3422, Fax: 02-570-3470
E-mail: pp99pp@dreamwiz.com

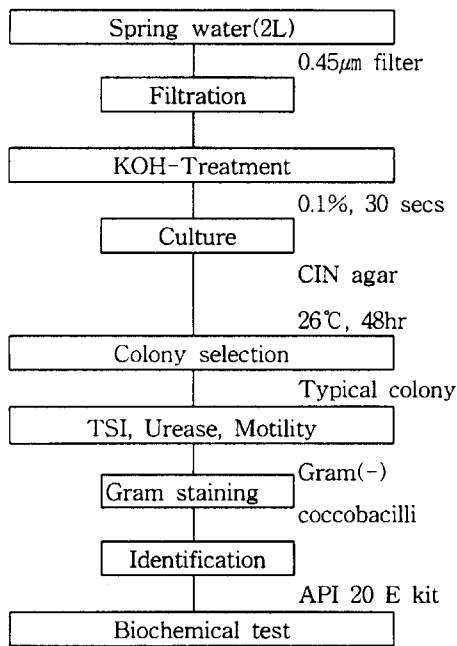


Fig. 1. Identification of *Y. pseudotuberculosis* isolated from spring waters.

정하였다(Fig. 1).

염색체 DNA 분리

Gerhardt (11)의 방법에 따라 다음과 같이 DNA를 분리하였다. 먼저 5 ml tryptic soy broth (TSB)에서 18-24시간 동안 진탕배양하여 집균한 다음 pellet을 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH8.0)로 2회 세척하였다. 다시 집균한 균액을 다시 TE buffer 567 µl에 재 부유시키고 10% SDS 30 µl, proteinase K (20 µg/ml in TE buffer) 및 RNase (10 µg/ml in TE buffer) 5 µl를 가하고 잘 섞었다. 37°C에서 1시간 반응시키고 난 후 5 M NaCl 100 µl을 첨가한 후 다시 65°C의 CTAB (Hexadecyl-trimethyl-Ammonium-Bromide, Sigma, 10% in 0.7M NaCl) 용액 80 µl를 가하고 천천히 흔들어 65°C에서 10분간 반응시키고 난후 동량(800 µl)의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)를 가했다. 15,000 rpm으로 원심분리를 하여 침액성의 상층액을 새로운 tube로 옮기고 다시 동량의 PCI (phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)를 가하여 격렬하게 손으로 흔들었다. 15,000 rpm에서 원심분리를 한 다음 상층액을 새로운 tube로 옮기고 0.6배(500 µl)의 isopropanol을 가하여 DNA 침전이 생길때까지 손으로 앞뒤로 흔들어 섞었다. 다시 15,000 rpm으로 5분간 원심분리를 하고 pellets에 70% ethanol을 가하여 침전물을 세척하였다. 진공건조기로 ethanol을 완전히 증발시켜 버리고 50 µl의 TE 완충액으로 용해한 후 RNase를 최종농도가 20 µg/ml 되도록 하여 42°C에서 1시간 반응하고 RNA를 완전히 제거하였다. 정제한 DNA는 UV spectrophotometer로 260 nm 파장에서 정량하고 -20°C에서 보존하면서 실험에 사용하였다.

병원성 확인시험

*Y. pseudotuberculosis*의 병원성 확인시험에는 *inv-1* (5'-TAA GGG TAC TAT CGC GGC GGA-3')와 *inv-2* (5'-CGT GAA ATT AAC CGT CAC ACT-3') primer (18)를 사용하였고, PCR 증폭반응은 주형 DNA 150 ng/µl, *inv* primer 50 pmol 각각 1 µl, 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂ 각각의 200 µM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2.5U Taq DNA polymerase를 포함하는 50 µl reaction mixture를 다음과 같은 조건으로 수행하였다.

94°C에서 1분간을 denaturation 하였고, 94°C에서 30초간, 55°C에서 1분, 70°C에서 2분간의 반응을 25회 반복하고 70°C에서 5분간 더 extension 시켰다. 음성대조 실험으로는 반응물에 template DNA를 넣지 않고 대신 멸균 증류수를 사용하였다.

전기영동

0.5×TBE buffer에 3% Nusieve 3:1 agarose gel을 녹인 다음 PCR 생성물 8 µl와 6배 농축 loading dye 1.2 µl를 섞어 1.5% agarose gel에서 50 volt로 약 40여분 동안 전기영동을 실시하였고 size maker로는 200bp DNA maker (TakaRa)를 사용하였다. Gel을 0.5 µg/ml 농도의 EtBr용액에 30분간 염색하고, 다시 증류수에 40분 이상 세척한 후 UV transilluminator로 밴드를 확인하였다.

16S rDNA의 증폭

*Y. pseudotuberculosis*의 16S rDNA 증폭을 위해 *E. coli* 16S rDNA의 conserved sequence를 기초로 primer인 16S-A (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3')와 16S-B (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (6)를 제작하였다(Table 1). PCR 증폭반응은 150 ng 주형 DNA 1 µl, 50 pmol primer 각각 1 µl, 50 µM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 각각의 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2.5U Taq DNA polymerase를 포함하는 50 µl reaction mixture를 우선 pre-denaturation 과정으로 94°C에서 3분간을 수행하였고 94°C에서 1분, 56°C에서 1분, 72°C에서 2분간의 반응을 총 30회 반복하고 72°C에서 5분간 반응시켰다. 음성대조 실험으로는 반응물에 template DNA를 넣지 않은 것을 사용하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers used in the PCR amplification and sequencing of 16S rDNA

Name	Sequence (5'-3')	Position
16S-A	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	8-27 ^a
536R	GWATTQACCGCGGCKGCTG	536-518
926R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	926-907
1100F	CAACGAGCGCAACCCT	1100-1115
1406R	ACGGGCGGTGTGTRC	1406-1392
16S-B	GGTACCTTGTTACGACTT	1509-1491

^a*Escherichia coli* numbering system

16S rDNA 염기서열 분석

Agarose gel에서 확인된 약 1.4 Kb의 증폭된 16S rDNA를 sequencing primer인 536R, 926R, 1100F, 1406R (Table 1)를 사용하여 Sanger (19) 등의 dideoxy nucleotide chain termination method가 적용된 PE biosystem사(USA)의 310 ABI Prism sequencer로 sequencing 하고 sequencing analysis version 3.3 software로 분석하였다.

계통수 작성

분석된 *Y. pseudotuberculosis*의 16S rDNA를 Clustal W (1.7) program을 이용하여 미국 NCBI genbank에 등록된 *Y. pseudotuberculosis* (Z21939), *Y. enterocolitica* (Z49830), *Y. inter-media* (X75279), *E. coli* (Z83205), *S. enteritidis* (U90318) 그리고 *P. vulgaris* (AJ233425)와 비교하여 각 균속간의 유전자간 유연관계를 조사하고 njplot WIN95 program으로 계통수를 작성하였다.

결과 및 고찰

분리균의 생화학적 성상

약수에서 분리된 5주의 *Y. pseudotuberculosis*는 indole, V.P. (25°C, 37°C), H₂S, phenylalanine, lysine, arginine, ornithine, gas from glucose, lactose, sucrose, sorbitol, oxidase, motility (37°C)가 모두 음성이고 urease, glucose, mannitol, salicin, catalase, motility (25°C)는 모두 양성을 나타내었다.

병원성 확인시험

서울 시내 380여곳의 약수에서 분리한 *Y. pseudotuberculosis* 5주에 대한 병원성 확인시험 결과 Fig. 2에 나타나 있듯이 Lane 1부터 4까지 공통된 295 bp의 공통된 *inv* 유전자 밴드형성을 볼 수 있었다. *inv* 유전자는 invasion을 coding하는 유전자로서 총 3938 bp로 구성되어 있는데 여기에 사용된 primer는 2255위치와 2549위치 사이를 증폭하여 총 295 bp의 생성물을 형성하게 된

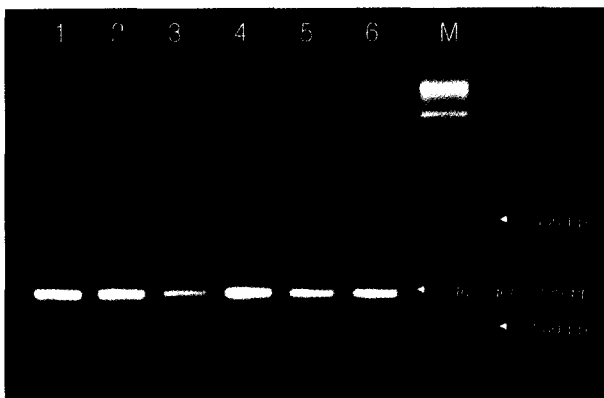


Fig. 2. Electrophoresis(1.5% Agarose gel) of nucleic acid amplification products from *Y. pseudotuberculosis* using *inv* primers. Lane 1 to 5, *Y. pseudotuberculosis*; Lane 6, control; *Y. pseudotuberculosis* ATCC 6902; M, 200 bp marker (TaKaRa).

다. 따라서 이부분이 검출되면 병원성을 소유하고 있는 것으로 판단할 수 있다. 병원성 유전자인 *ail* (attachment invasion locus)과 *yst* (heat-stable enterotoxin) 유전자를 이용한 전년의 연구결과 (5)에서는 약수에서 분리된 *Y. enterocolitica* 65주 모두가 병원성이 없는 것으로 판명되었는데, 이번 *Y. pseudotuberculosis*에 대한 병원성 확인시험에서는 분리된 5주 모두 병원성 유전자를 소유하고 있는 상반된 결과를 나타내었다. 이는 최초로 서울시 상계 백병원에서 발생한 *Y. pseudotuberculosis*의 감염증과도 깊은 연관성을 나타내는 결과로서 앞으로 *Y. enterocolitica*보다 *Y. pseudotuberculosis*에 대한 risk 감시체계를 확고히 할 필요가 있음을 보여주는 단적인 예이다.

보통 약수에서 *Yersinia* 속의 분리율은 *Y. enterocolitica*가 상대적으로 높지만 병원성이 떨어지고 반면 *Y. pseudotuberculosis*는 낮은 분리율을 보이거나 상대적으로 높은 병원성을 보이는 것이 사실이다. 앞으로 *Y. pseudotuberculosis*에 대한 분리율을 높이고 정확한 병원성의 동정을 위해 PCR등의 분자생물학적인 방법을 사용하는 것이 매우 효율적이라 생각된다.

16S rDNA의 증폭

약수에서 분리된 *Y. pseudotuberculosis* 5주의 chromosome DNA를 분리하고 16S rDNA를 증폭하여 1.0% agarose gel로 1시간 가량 전기영동한 결과, 모든 시험균주에서 뚜렷한 약 1.4Kb 정도의 PCR product가 증폭되었다(Fig. 3).

16S rDNA 염기서열 분석

Y. pseudotuberculosis 5주의 16S rDNA 염기서열을 NCBI Genbank에 등록된 다른 *Y. pseudotuberculosis* (Z21939), *Y. enterocolitica* (Z49830), *Y. intermedia* (X75279)와 *E. coli* (Z83205), *S. enteritidis* (U90318) 그리고 *P. vulgaris* (AJ233425)와 비교 분석하여 유전자간 상관성을 알아본 결과 *Yersinia* 속 간에는 97.5%에서 100%의 높은 상동성(Similarity)을 나타내었다



Fig. 3. Electrophoresis(1.5% Agarose gel) of 16S rDNA produced by PCR using 16S-A and 16S-B primers from the *Y. pseudotuberculosis*. Lane M, 200 bp marker (Takara); Lane 1 to 5, *Y. pseudotuberculosis* isolated from spring waters; Lane 6, control; *Y. pseudotuberculosis* ATCC 6902.

Table 2. Similarity matrix based on 16S rDNA sequences between *Yersinia* strains and other enteric bacteria(gap included)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2	99.9									
3	99.9	99.9								
4	100.0	99.9	99.9							
5	99.9	99.9	99.9	99.9						
6	99.9	99.9	99.8	99.9	99.9					
7	97.7	97.5	97.6	97.7	97.6	97.7				
8	97.9	97.7	97.8	97.9	97.8	97.9	97.9			
9	94.6	94.5	94.5	94.6	94.5	94.6	95.1	94.7		
10	93.8	93.7	93.8	93.8	93.8	93.8	94.2	93.7	97.7	
11	94.1	94.0	94.0	94.1	94.0	94.1	94.0	93.0	93.2	92.9

1, *Y. pseudotuberculosis*(Z21939^a); 2, P1; 3, P2; 4, P3; 5, P4; 6, P5; 7, *Y. enterocolitica*(Z49830); 8, *Y. intermedia*(X75279); 9, *E. coli*(Z83205); 10, *S. enteritidis*(U90318); 11, *P. vulgaris*(AJ233425).

^aGenbank accession No.

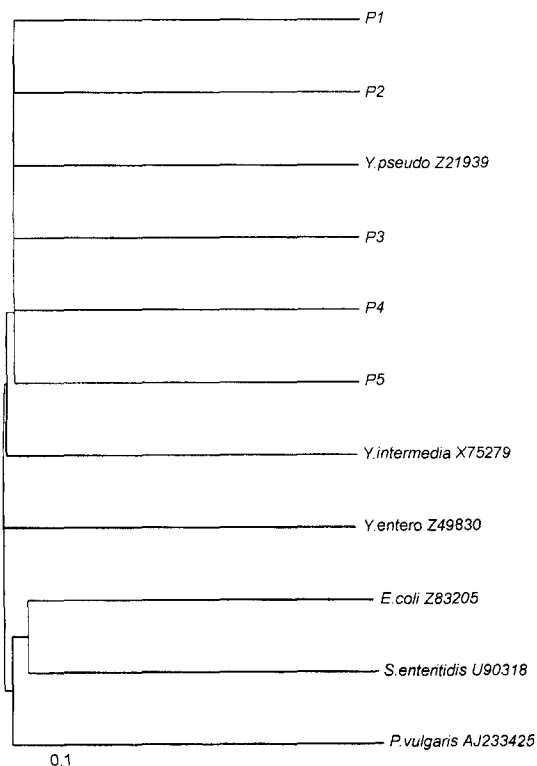


Fig. 4. Phylogenetic relationships of *Yersinia* strains and other enteric bacteria, based on 16S rDNA analysis. Bar represents 0.1% sequence divergence.

(Table 2). 특히 P3와 *Y. pseudotuberculosis* (Z21939) 간에는 100%로 가장 밀접한 상동성을 나타내었고 P2와 *Y. enterocolitica* (Z49830)는 상동성이 97.5%로 가장 낮은 상동성을 보여주었다. 흥미로운 것은 *Y. enterocolitica*, (Z49830)와 *Y. intermedia* (X75279)를 제외하면 나머지 P1, P2, P3, P4, P5, *Y.*

pseudotuberculosis (Z21939) 간에는 거의가 99.9%의 높은 상동성을 나타내었다는 점이다. 이것은 고전적인 분리방법과 시판중인 동정용 API 20 E kits의 병용사용 결과가 유전학적 분석방법과 정확히 일치함을 의미한다. 또한 분리된 *Yersinia*속 균들과 다른 장내세균 등과의 관계는 93.0%에서 95.1%로 상동성이 현저히 감소됨을 알수 있었다.

계통수 분석

각 균주간의 16S rDNA 염기서열 분석자료를 토대로 njplot WIN95 program을 이용하여 dendrogram을 작성한 결과 약수에서 분리된 5주의 *Y. pseudotuberculosis*와 *Y. pseudotuberculosis* (Z21939), *Y. enterocolitica* (Z49830), *Y. intermedia* (X75279)간에는 하나의 유사한 cluster를 형성하였다. 특히 *Y. enterocolitica* (Z49830)는 *Y. intermedia* (X75279)와의 유사성이 97.9%로, 오히려 *Y. pseudotuberculosis*의 유사성 97.7% 보다 더 높은 유전적 상관관계를 나타내었다. 또한 *E. coli* (Z83205), *S. enteritidis* (U90318) 그리고 *P. vulgaris* (AJ233425)가 하나의 cluster를 형성하였는데 특히 *E. coli* (Z83205)와 *S. enteritidis* (U90318)가 더욱 밀접한 연관성을 나타내었다(Fig. 4).

이상의 결과로 16S rDNA의 염기서열 분석에 의한 연구는 *Yersinia* 속균의 동정 및 분류, 그리고 혈청학적으로 동정이 불가능한 균주의 정확한 동정 등에 폭넓게 활용될 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

1. 박석기. 2000. 병원미생물시험법 IV. p178-186. 서울특별시 보건환경연구원.
2. 서정국. 1996. PCR에 의한 병원성 *Yersinia pseudotuberculosis* 및 *Yersinia enterocolitica*의 동정. 박사학위논문. 중앙의대.
3. 송원근. 2000. 16S rDNA 분석과 REP-PCR Genomic Fin-

- gerprinting에 의한 *Yersinia pseudotuberculosis*의 분자학적 분류. 박사학위논문. 중앙의대.
4. 유인환. 1998. 16S rDNA 분석에 의한 *Yersinia* 속균의 분자진화 및 동정법 개발. 석사학위논문. 중앙의대.
 5. 이영기. 1999. 서울시내 약수에서 분리한 *Yersinia enterocolitica*의 생물형, 혈청형 및 분자형 특성에 관한 연구. 박사학위논문. 단국대.
 6. Borrell, Nuria, Acinas, G. Silvia, Figueras, Maria-Jose, and J. M. Antonio. 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1671-1674.
 7. Drygin, Y. F., I. B. Sakhuriya, and I.I. Vorob'ev. 1995. Detection of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* by PCR amplification of 16S rRNA and its genes. *Mol. Biol.* 29, No.6 part 2, 791-797.
 8. Erik, C.B. 1989. Rapid determination of bacteria ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 65, 171-176.
 9. Ewing, W.H. 1986. Edward and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th., Elsevier science publishing Co., New York, 461-476.
 10. Gemski, P., R.L. Janet, T. Case, and J.A. Wohlhieter. 1980. Presence of a virulence-associated plasmid in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infec. Immun.* 28, 1044-1047.
 11. Gerhardt, P.M., W.A. Wood, and N.R. Krig. 1994. Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 12. Hiroshi, F., F. Manabu, S. Kanji, and K. Seiji. 1988. *Yersinia pseudotuberculosis* infection contracted through water contaminated by a wild animal. *J. Clin. Microbiol.* 26, 584-585.
 13. Hiroshi, F., G. Manabu, K. Seiji, R. Misao, and T. Nobuaki. 1994. Restriction endonuclease analysis virulence plasmids for molecular epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* infections. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1410-1413.
 14. Ibrahim, A., B. M. Goebel, and W. Liesack. 1993. The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 173-178.
 15. Jurgen, Brosius., L. P. Margaret, and J. K. Poindexter. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, No. 10. 4801-4805.
 16. Kanko, S., T. Maruyama, and H. Fuku-shima. 1991. Comparison of plasmid DNA among different serogroups of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 12, 75-79.
 17. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, 498-506.
 18. Nakajima, H., Inoue, M., Mori, T., and K. Itoh. 1992. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2484-2486.
 19. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5647.
 20. Stephen, J.G., F.D. Edward, and J.O. Gary. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170, 720-726.
 21. Tetsuji, N., K. Tomoko, and S. Kiyomi. 1997. Identification of pathogenic strains within serogroups of *Yersinia pseudotuberculosis* and the presence of non-pathogenic strains from animals and the environment. *J. Vet. Med. Sci.* 59(3), 153-158.
 22. Sou-Ichi, M., O. Yumiko, M. Tsutomu, and K. Seiji. 1994. PCR-based random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications. *J. Clin. Microbiol.* 32, 65-69.

(Received January 22, 2001/Accepted March 13, 2001)

ABSTRACT: Molecular Taxonomy based on 16S rDNA Analysis and Pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis* Isolated from Spring Waters

Young Kee Lee*, **Sung Min Choi**, **Soo Kyung Oh**, **Kang Moon Lee**, and **Ryeom, Kon¹**
(¹Microbial Inspection Team, Seoul Metropolitan Government of Institute of Health and Environment, Yangjae-dong, Seocho-gu, Seoul 137-130, ¹Department of Microbiology, Dankook University, Chunan 330-714, Korea)

In order to investigate the pathogenicity and development of differential identification technique in the *Yersinia* species and other enteric bacteria, we isolated 5 strains of *Y. pseudotuberculosis* from spring water sites in Seoul. The biochemical characteristics of isolated strains revealed that indole, VP(25°C, 37°C), H₂S, phenylalanine, lysine, arginine, ornithine, gas from glucose, lactose, sucrose, sorbitol, oxidase and motility(37°C) were all negative and urease, glucose, mannitol, salicin, catalase and motility(25°C) were all positive. To detect the causative agent of pseudotuberculosis(*Y. pseudotuberculosis*), we carried out a study using a PCR with *inv* primers complementary to the pathogenic region and found that all strains were positive; this revealed that strains from spring waters were pathogenic. Also 16S rDNA for total 5 strains of *Y. pseudotuberculosis* were amplified and a stretch of approximately 1,450 nucleotides were sequenced and analyzed. The 16S rDNA nucleotide sequence homologies among *Yersinia* species ranged 97.5% to 100% and between *Y. pseudotuberculosis* and other enteric bacteria they ranged 93.0% to 95.1%. The Phylogenetic tree generated from the sequence analysis of the 16S rDNA gene showed 3 coherent clusters that could be separated into *Y. pseudotuberculosis* strains, some *Yersinia* species strains and other enteric bacteria strains.