

非色素性 *Serratia marcescens*의 分離 同定

慶北大學校 醫科大學 細菌學教室

安武植 · 鄭在奎 · 趙東澤

=Abstract=

Identification of non-pigmented *Serratia marcescens*

Moo-Sik Ahn, Jae Kyu Chung and Dong Taek Cho

Department of Bacteriology, Kyungpook National University, School of
medicine, Taegu, Korea

Among clinical isolates, most strains of *Serratia marcescens* were belonged to nonpigmented form, and several attempts were undertaken for the rapid and simple identification of these strains.

Prodigiosin production of non-pigmented strains was uniformly negative in many kinds of solid media as well as in nutrient agar added with various amino acids and thiamine.

On blood agar, colonies of *S. marcescens* turned gradually to grey or dark color by the lapse of incubation period and this characteristic seems to be able to utilize as an indicator for a primary isolation, and also generally paralleled with the results of dehydration of Tween 80 and lipase activity in soy bean oil medium although these reactions were by no means specific to *S. marcescens*.

In order to rule out these non-specific reactions, other tests such as oxidase and sucrose fermentation are required for the final confirmation of this species.

緒 論

*Serratia marcescens*는 近來 各種 感染症^{1,2)}에 많이 관여하며 臨床의으로 점차 重要視 되어가고 있다. 本 菌種은 독특한 prodigiosin 色素形成에 의하여 同定이 容易하나 患者에서 分離한 菌株은 色素非產生株가 더 많으며 이런 菌株은 복잡한 生化學的 反應을 거쳐야만 同定이 가능하며 따라서 좀 더 간편한 同定法이 요청되고 있다.

Davis等³⁾은 일찌기 corn oil等을 利用하여 腸內桿菌의 lipase 活性을 관찰하였던 바 *Serratia*種 및 *Enterobacter*種이 陽性을 나타내며 菌種 判別に 利用價値가 있음을 報告하였으며, Lovell等⁴⁾은 Tween 80의 加水分解性을 利用하여 *S. marcescens*을 他種 腸內桿菌과 鑑別할 수 있다고 하였다. 著者等은 分離菌을 혈액배지에 培養하여 形成된 集落中 *S. marcescens*은 그 色素形成이 特異함에 착안하여 本 菌種의 分離 同定을 시도하였으며 上記한 lipase活性 및 Tween 80 分解 性狀과 比較하여 그 價値를 평가하였다. 그리고

色素非產生株에 대하여 培地 種類 및 各種 amino acid 成分이 色素 產生에 미치는 影響에 對해서도 아울러 검토하였다. 色素 產生에 관한 연구는 많으며 그 中 proline 및 methionine¹⁾을 利用하여 prodigiosin 產生狀을 관찰한 報告를 볼 수 있다.

材料 및 方法

使用菌株 : *S. marcescens*는 患者에서 分離한 無色株 6株, 有色株 2株 및 有色株에서 分離한 無色株 2株 포함 10株이며 이 外에 對照菌으로서 *Pseudomonas aeruginosa* 3株, *E. coli* 3株, *Proteus vulgaris* 3株, *Sh. flexneri* 3株, *S. paratyphi A* 3株, *Enterobacter* 2株, *Acinetobacter* 10株, *Alcaligenes fecalis* 1株를 使用하였다.

培地 : Nutrient agar를 위시하여 trypticase soy agar, peptone glucose extract agar, Sabouraud glucose agar, E.M.B., MacConkey medium, Tween 80 medium(tryptose blood agar base 3.3%, Tween 80 0.4%, CaCl₂ 0.015%) 및 大豆油培地 (Peptone 10g, yeast extract 3.0g, NaCl 5.0g, agar 20g, victoria blue 100,0ml (1:1000 수용액) ag. dest. 900ml, PH 7.8로 修正, 大豆油 5%) 그리고 amino acid 培地는 上記 nutrient agar에 ml당 100 μ g의 20種의 amino acid, thiamine 및 nicotinic acid를 各各 첨가하여 調製하였다.

*S. marcescens*에 對한 生化學的 試驗 : 分離株 8株에 對해서 菌種同定에 必要한 IMViC試驗, 運動性, gelatin. 液化試驗, H₂S 產生性, lysin, ornithine decarboxylase 試驗 및 arabinose, raffinose, rhamnose 발효시험을 하였다.

Prodigiosin 產生狀 : 色素產生의 培養溫度別 關係를 보기 위해서 trypticase soy agar 및 trypticase soy broth에 菌을 接種하고 37°C 및 25°C에 培養하고 色素產生狀을 比較하였다. 이 外에 各種 固型培地에 接種하고 25°C에 培養하여 色素產生狀을 菌株別로 觀察하였다. amino acid 培地에서 色素形成狀을 보기 위해서 proline 加 培地에 無色株를 4代 通過시켜 色素 產生狀을 觀察하였다.

Tween 80 培地 및 大豆油培地의 集落 : Tween 80을 加水分解한 集落은 周圍에 不透明帶를 形成하며 大豆油培地에서는 lipase 陽性菌은 發育이 旺盛한 乳白色集落을 形成하였다.

血液 平板上的 集落 : 供試菌株의 血液 平板上的 集

落의 色調 形成狀을 經時的으로 觀察하였다. 菌株의 溶血狀과도 관계되며 時間의 經過에 따라 黑色調를 띄게 됨으로 菌株別 差異를 記錄하였다.

成 績

*S. marcescens*는 必要한 生化學的 試驗을 行한 結果 本 菌種으로 同定되었으며 trypticase soy agar 上的 prodigiosin 產生狀은 第1表와 같이 37°C 培養으로는 有色株도 色素를 產生하지 않았으나 25°C에 培養하면 色素를 잘 產生하며 無色株인 菌株 7a 및 菌株 8a도 약간 色調를 形成하였다. 이 2株는 色素產生株인 菌株 7 및 菌株 8에서 誘出した 變異株이나 患者에서 分離한 無色株 6株는 이런 性狀이 나타나지 않았다.

Table 1. Pigment formation of *Serratia marcescens* on trypticase soy agar

Incubation	37°C	25°C
(Strain)		
1	—	—
2	—	—
3	—	—
4	—	—
5	—	—
6	—	—
7	—	++
8	—	++
7a	—	±
8a	—	±

++ ; Strong pigment

± ; Weak pigment

— ; Negative

Trypticase soy broth에 發育한 菌株는 色素形成이 顯著하지 않으며 色調株는 液體上層에 色素를 유리시키고 있다.

各種 固型培地에 形成된 prodigiosin 產生狀은 第2表와 같이 色素產生株인 菌株 7 및 菌株 8은 明白한 色素가 產生되나 殘餘 無色株는 色素產生을 볼 수 없었다. peptone glucose extract agar에서는 無色株 中에서 매우 미약한 淡紅色調를 볼 수 있었다. E.M.B. 및 MacConkey 培地에서도 全 供試株가 赤色調를 形成하였으나 有色株와 無色株의 差異가 없으며 他 腸內

Table 2. Pigment formation of *S. marcescens* at 25°C on various media

Media	Nutrient agar	Peptone glucose extract agar	Sabouraud media	Tween 80 media	Soybean media	E.M.B.	MacConkey media	Chocolate agar
(Strain)								
1	-	-	-	-	-	±	±	-
2	-	-	-	-	-	±	±	-
3	-	-	-	-	-	±	±	-
4	-	±	-	-	-	±	±	-
5	-	±	-	-	-	±	±	-
6	-	-	-	-	-	±	±	-
7	++	++	±	±	±	±	±	±
8	++	++	±	±	±	±	±	±
7a	±	±	-	-	-	±	±	-
8a	-	±	-	-	-	±	±	-

Table 3. Pigment formation of *S. marcescens* on peptone glucose extract agar added with proline by successive transfer

Transfer	1	2	3	4
(Strain)				
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	±	±	±
6	-	-	-	-
7a	±	±	±	±
8a	±	±	±	±

Table 4. Tween 80 hydrolysis and lipase formation in soy bean medium by *S. marcescens* and other enteric organisms at 37°C

Species	No. of tested strains	No. of hydrolysis positive strains	No. of lipase positive strains
<i>S. marcescens</i>	10	10	10
<i>Ps. aeruginosa</i>	3	3	3
<i>P. vulgaris</i>	3	0	3*
<i>Sh. flexneri</i>	3	0	0
<i>E. coli</i>	3	0	0
<i>S. typhi</i>	3	0	0
<i>S. paratyphi A</i>	3	0	0
<i>E. aerogenes</i>	2	0	2
Acinetobacter sp.	10	4	4
<i>A. fecalis</i>	1	0	0

*Weakly positive

性 菌에 比하여 色調應成이 緩저하였다.

各種 amino acid 및 thiamine加 培地에서 菌株 7a 및 菌株 8a 中에는 微弱한 色調를 띤 集落이 形成되는 例가 있었으나 그 性狀은 明白하지 않았다(表 省略). Peptone glucose extract agar에서 prodigiosin 產生이 다소 緩저하므로 여기에 proline을 첨가한 培地를 調製하여 供試株를 4代 繼代 하였던 바 그 成績은

第3表와 같이 色素產生은 明白하지 않았으며 繼代로서 그 性狀이 促進되지 않았다.

Tween 80 分解와 大豆油를 分解하는 性狀을 관찰하면 第4表와 같다. *S. marcescens*는 供試株 全部가 兩 反應이 陽性이었으며 綠膿菌 3株도 兩 反應이 모두 陽性이었다. 그리고 *P. vulgaris*와 *Enterobacter*는 大豆油를 分解하였으며 *Acinetobacter*는 10株 中 4株

Table 5. Colonial pigmentation of *S. marcescens* and other enteric organisms on blood agar

Species	No. of species	Incubation			
		37°C		25°C	
		24h	48h	24h	48h
<i>S. marcescens</i> (nonpigment)	8	wite	grey	white	grey ^d
<i>S. marcescens</i> (Pigment)	2	"	"	red	red
<i>Ps. aeruginosa</i>	3	white ^a	grey ^b	white	grey
<i>P. vulgaris</i>	3	"	white	"	white
<i>E. coli</i>	3	"	"	"	"
<i>Sh. flexineri</i>	3	"	"	"	"
<i>S. typhi</i>	3	"	"	"	"
<i>S. paratyphi</i>	3	"	"	"	"
<i>E. aerogenes</i>	2	"	"	"	"
<i>Acinetobacter</i> sp.	10	"	white ^c	"	"
<i>A. fecalis</i>	1	"	grey	"	grey

a : One strain was grey color
c : 2 strains were grey color

b : One strain was dark color
d : 2 strains were white color

Table 6. Colonial characteristics of *S. marcescens* on Tween 80 medium, soy bean medium and blood agar

Media	Tween 80 medium	Soy bean medium		Blood agar
Strains	Hazy zone	Pigment(white colorppps)		Grey color
1	±*	-	±	±
2	++	-	+	+
3	+	-	+	±
4	++	-	+	+
5	±	-	+	±
6	++	-	+	+
7	++	+	red	+
8	++	+	red	+
7a	++	-	+	+
8a	++	-	+	+

*Reaction weak or delayed

Table 7. Differentiation of *Pseudomonas*, *Serratia* and *Acinetobacter*

Tests or substrates	<i>Pseudomonas</i>	<i>Serratia</i>	<i>Acinetobacter</i>
Pyocyanin and oxidase	+ or -	-	-
Lysine decarboxylase	-	+	-
Lactose fermentation	-	±	-
Sucrose fermentation	±	A	-

A : Acid ± : Variable

가 兩 反應이 陽性이었으며 殘餘 供試菌種은 모두 兩 反應이 陰性이었다.

血液平板培地에 發育한 集落의 色素形成狀을 관찰하면 第5表와 같다. 37°C 배양균과 25°C 배양균을 비교하였던 바 37°C 培養菌의 色素形成이 多少 明白한 것 같았다. 24시간 후에는 색소형성이 일어나지 않았으나 48時間 以後가 되면 灰白色으로 着色하며 時間의 경과로서 더욱 현저하여졌다. *S. marcescens*는 37°C 배양으로 有色株, 無色株 모두 이런 狀況을 나타내었으며 녹농균도 全株가 이런 性狀을 나타내었으나 그 中 1株는 이 性狀이 매우 현저하였으며 *A. fecalis* 1株도 이런 性狀을 나타내었고 *Acinetobacter*種 10株 中 2株도 灰白色으로 着色하였다. 그러나 殘餘 供試菌種은 이런 性狀이 없었다.

*S. marcescens*의 菌株別 Tween 80 분해, 大豆油 분해 및 혈액평판상의 集落着色狀을 관찰하면 第6表와 같다. 菌株別 差異가 있으며 菌株 1, 3 및 5는 Tween 80 분해狀이 弱하며 배양 48시간 後에 集落周圍에 不透明帶가 나타났다. 그리고 이런 性狀은 血液平板培地의 集落 着色과도 一致하였다. 그러나 大豆油 分解狀과는 一致하지 않았다.

考 察

*S. marcescens*에 의한 감염증이 敗血症⁹⁾을 위시하여 尿路⁵⁾, 心內膜炎等 各種 疾患에 關係함에 따라 이 菌의 分離同定은 臨床의으로 重要한 課題가 되었으며 非色調株의 簡易하고 正確한 診斷이 요망되고 있다.

Prodigiosin 產生에 있어서는 proline¹⁰⁾이 關係하며 本 菌에 의하여 色表形成에 直接 利用될 뿐 아니라 發育정지된 菌體에 加해도 色素產生이 일어난다고 한다. 그러나 著者等の 成績으로는 이 物質을 培地에 加해서 培養하였으나 발육균은 色素株, 非色素株 間에 別 差異가 없이 prodigiosin 產生을 促進하지 못하였다. 그 外 各種 amino acid를 加한 배지에 菌을 배양하

였으나 色素產生이 일어나지 않았다. 그리고 各種 固型培地에서 形成된 色素產生狀도 明白하지 않으며 따라서 一般 分離培地에서는 色素產生이 促進되는 경우가 없는 것 같다. 그리고 색소산생에는 發育온도가 關係하며 37°C 보다 25°C 배양시에 명백하였다⁷⁾. E.M. B. 및 MacConkey 배지에서 赤色을 나타내나 이는 培地 中에 함유된 色素에 의한 것으로 思料된다. 그러나 赤色도가 他 種 腸內桿菌에 比해서 높으며 여기에는 本 菌의 prodigiosin이 加味된 까닭인지 모르며 分離에 多少 참고가 될 것 같다.

*Serratia*는 *S. marcescens*, *S. liquefaciens* 및 *S. rubidaea*의 3種이 있으며 이는 ornithine decarboxylase 및 arabinose fermentation에 의해서 區別되며¹¹⁾ 分離株는 *S. marcescens*가 大部分을 차지한다. 著者等이 供試한 菌株도 모두 *S. marcescens*이었다.

S. marcescens 및 各種 腸內桿菌에 對하여 Tween 80 分解 및 大豆油 分解狀을 比較 觀察 하였던 바 *S. marcescens* 全株 및 綠膿菌 3株가 陽性이었다.

Davis³⁾ 및 Lovell¹²⁾은 綠膿菌을 實驗에 使用하지 않았으며, Davis의 corn oil에 對한 lipase 試驗에서 *P. vulgaris* 및 *Enterobacter*가 陽性이라는 所見은 著者等の 成績과 一致하였다. 그러나 上記 2 菌種은 Tween 80을 分解 못하므로 大豆油 lipase 試驗은 *S. marcescens* 同定에 適合하다 할 수 없으며, 成績判定도 Tween 80 培地가 明白한 데 比해서 大豆油 培地는 集落性狀이 明白하지 않으며 또 培養 時間이 길어서 判定이 곤란하였다. 그리고 *Acinetobacter* 中에 Tween 80 및 大豆油 分解株가 있었으므로 이 兩 反應이 *S. marcescens* 同定에 特異의이라 할 수가 없다. Tween 80의 分觀酵素는 lipase가 아니며 一種의 esterase로서 Tween 80에서 遊離된 脂肪酸이 칼슘과 結合해서 不透明特質이 形成된다.

血液平板에 發育한 菌은 溶血을 일으키면서 色調를 形成하는 경우를 흔히 볼 수 있다. *S. marcescens*도 이런 性狀이 있으며 集落周圍의 變色보다 集落 自體의

黑色調가 特異하며 이 菌의 prodigiosin 產生과 관련이 있는지 모른다. 다만, 이 性狀은 時間이 經過해야 하는 點과 明白한 判定이 어렵다는 不利한 點이 있으나, 대체로 Tween 80 및 大豆油培地의 成績과 一致하였으며 本菌 分離에 利用할만한 價値가 있는 것으로 思料된다.

以上 成績을 基準으로 *S. marcescens*의 同定 節次를 提示하면,

- ① 臨床材料을 血液平板에 培養하여 48時間 혹은 그 以後에 黑色調를 띄는 集落을
- ② Tween 80 培地에 移植하여 集落 周圍에 不透明 帶가 形成되면
- ③ 第7表에 의하여 pyocyanin 產生과 oxidase 試驗으로서 綠膿菌을 區別하고
- ④ Lactose, sucrose 발효시험으로 *Acinetobacter* 를 鑑別하므로써 *Serratia*種을 同定할 수 있으며
- ⑤ Arbinose 分解 및 ornithine decarboxylase 試驗으로 *S. marcescens*를 確定할 수 있다.

要 約

*Serratia marcescens*의 同定을 分離培地를 利用하여 簡便한 方法으로 시도하였던 바 prodigiosin 產生은 proline을 위시해서 各種 amino acid, thiamine 및 nicotinic acid에 의해서 항진되지 않았으나 血液平板培地에서 本菌種은 時間의 經過에 따라 黑色調를 띠는 集落을 形成하며 이는 一次的인 分離基準으로 利用될 수 있을 것 같다.

Tween 80 및 大豆油 分解性은 本菌에서 陽性이며 同定에 利用될 수 있으나 特異反應이 아니다. 그러므로 마지막으로 oxidase 反應, lactose 및 sucrose 발효시험이 本菌種의 確定에 수반되어야 한다.

參 考 文 獻

1. Maki, D.G., C.G. Hennekenes, C.W. Phillips, W.V. Shaw, and J.V. Bennett. Noscomial urinary infection with *Serratia marcescens*: an epidemiological study. *J. Inf. Dis.* 128 : 579, 1973.
2. 정 태훈, 김 병구, 윤 응삼, 이 중기 : *Serratia marcescens*의 Gentamicin, Carbenicillin 및 Kanamycin에 대한 감수성에 관하여, 내대한과학회지. 19 : 614, 1976.
3. Davis, B.R., and W.H. Swing. Lipolytic, peptolytic, and alginolytic activities of *Enterobacteriaceae*. *J. Bact.* 88 : 16, 1964.
4. Lovell, D.J., and D.J. Bibel. Tween 80 medium for differentiating nonpigmented *Serratia* from other *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 5 : 245, 1977.
5. Lim, D.V., S.M. Hussain Qadri, and R.P. Williams. Incorporation of proline into prodigiosin by a put mutant of *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 : 738, 1976.
6. Qadri, S.M.H., and R.P. Williams. Role of methionine in biosynthesis of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *J. Bact.* 116 : 1191, 1973.
7. Joklik, W.K., and H.P. Willet. *Microbiology*. Appleton Century Co., 16th Ed, PP 569, 1976.
8. Dodson, W.H. *Serratia marcescens* Septicemia. *Arch. Intern. Med.* 121 : 145, 1968.