

## Vibrio 속 세균 동정에 대한 자동화동정 시스템의 비교

권주리 · 박진숙\*  
한남대학교 미생물학과

해수로부터 *Vibrio* 속 세균 21 균주를 분리하여 이들의 표현형적 특성을 조사하고 자동화 동정 시스템인 Vitek과 MIDI를 이용하여 동정하고 결과를 비교하였다. Vitek과 MIDI를 이용한 *Vibrio* 속 세균의 동정시 일치하는 결과는 단 1 건(TL33, *V. alginolyticus*)이었으며, Vitek의 경우 21 균주 중 16 균주(76%), MIDI의 경우 21 균주 중 6 균주(29%)가 동정되었다. *Vibrio* 속 세균의 동정에는 MIDI에 비하여 Vitek 시스템이 유용한 것으로 사료된다.

**Key words** □ identification, MIDI, vibrio, Vitek

전통적으로 세균의 동정과 분류는 표현형적 유사성에 근거하여 이루어져 왔으며, 현재도 임상, 생태 및 산업적으로 유용한 세균의 동정 및 분류에 이용되고 있다. 생리·생화학적 특성을 비롯한 표현형적 특성의 실험에는 많은 시간과 노동력이 소요되며 배양조건에 따라 혹은 실험자에 따라 결과의 판정이 달라지는 어려움이 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 미생물 자동화 동정 기기(Automated Microbial Identification System)의 개발이 이루어져 왔으며, 이들 미생물 자동화 동정 기기들은 병원미생물, 식품미생물 뿐만 아니라 미생물 응용분야에서 많은 연구자들에 의해 신물질 탐색시 미생물 동정단계에서 널리 사용되고 있다. 종류로는 미생물의 기질 분해능을 근거로 하여 동정하는 Vitek system (bioMérieux, France), Biolog (Biolog Inc., USA) 등(2)과 미생물의 지방산 조성과 그 함량비를 조사하여 동정에 이용하는 MIDI system (MIDI Inc., USA) (4,7) 등이 있다. 이들 시스템은 컴퓨터를 이용하여 결과를 판정하고, 이미 보유하고 있는 data base와 비교하여 동정하는 방식으로, Vitek은 현재 800종, Biolog 1,973종, MIDI는 2,400종의 data base를 확보하고 있다. 이러한 미생물 동정 시스템은 실험자의 주관적인 견해를 배제하고 소요시간을 줄여 준다는 장점이 있으나 아직까지 미생물의 동정을 표현형적 특징에만 의존하여 수행한다는 단점이 있다. 또한 몇몇의 연구에서 병원미생물과 식품미생물의 동정에 있어 이들 시스템의 유용성에 대한 고찰이 있었으나(3,8) 환경, 특히 해양미생물에 관한 고찰은 이루어지지 않고 있다. 환경 시료로부터 분리한 미생물의 동정에 대한 미생물 자동화 동정시스템의 유용성이 밝혀지지 않은 상태이나, 많은 응용 미생물 분야의 연구자들에 의해 미생물 동정단계에서 널리 사용되고 있어, 여러 환경시료에 대한 자동화 동정 기기의 평가가 요구된다. 따라서 본 연구에서는 해양시료에 우점하고 있는 *Vibrio* 속 세균을 대상

으로 Vitek과 MIDI시스템을 이용하여 동정하고, 각 시스템의 유용성과 문제점을 알아보려고 하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용배지

본 연구에서 사용된 기본배지는 MR (Marine Broth, Difco, Detroit, USA)이며, 균주의 분리 배지는 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar, Difco, Detroit, USA)를 사용하였다. 또한 균체지방산 분석을 위한 배지로는 TSB (Trypticase Soy Broth, Difco, Detroit, USA)를 사용하였다. 모든 균주는 20% glycerol이 첨가된 MR 배지에 혼합하여 -80°C에 저장하였다.

#### 균주의 분리 및 생리·생화학적 특성 조사

신진도 일대의 해수 및 어패류로부터 *Vibrio* 선택 배지인 TCBS 배지를 이용하여, 30°C에서 1~3 일간 배양하여 운동성이 있고, 노란색이나 녹색을 띄는 23개의 집락을 *Vibrio* 속 세균으로 분리하였다. 표준균주로는 *V. alginolyticus* IFO15630<sup>T</sup>, *V. proteolyticus* ATCC15338<sup>T</sup>, *V. parahaemolyticus* ATCC17802<sup>T</sup>, *V. fluvialis* KCTC2573<sup>T</sup>, *V. vulnificus* ATCC37564<sup>T</sup>를 사용하였다. 그람염색 및 세균세포의 형태관찰은 30°C에서 18~24 시간 배양 후 수행하였으며, 운동성은 0.8% agar를 첨가한 MR 배지에 탐침법을 이용하여 관찰하였다. 각 균주의 성장 가능한 염 농도를 조사하기 위해 LB (Luria Bertani, Difco, Detroit, USA) 배지를 기초 배지로 하여 염농도를 각각 0, 0.5, 1.0, 1.5, 5, 10, 15 및 20% (w/v)로 조제하여 30°C에서 3 일간 배양 후 집락 형성의 유무를 관찰하였다. Catalase test와 oxidase test는 Smibert와 Krieg (6)의 방법을 사용하였다.

#### Vitek system을 이용한 동정

Gram-negative Identification Card (GNI, Product No. V1305)

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 042-629-7498, Fax: 042-629-8355  
E-mail : jspark@mail.hannam.ac.kr

**Table 1.** Biochemical characteristics of *Vibrio* isolates and type strains determined by Vitek system

Strains	DP	UR	ML	IN	AR	TL	OF	CI	MN	AI	GL	MA	XY	CO	AR	AC	TD	RA	H <sub>2</sub> S	LY	ES	PX	SO	ON	ORN	PL	LA	SU	RH	OX
TL1-1	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
TL4-1	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TL6	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
TL7-2	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
TL12	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
TL15	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TL19	+	+	+	-	-	N	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
TL21-1	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
TL21-2	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
TL23	-	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
TL27	+	-	+	-	-	N	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
TL33	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
TL36-2	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
TL43	+	-	+	-	+	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
TL50-3	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
TL56	-	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TL57-1	+	-	+	-	-	N	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
TL57-2	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TL74	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
TL78-2	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
TL78-3	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>V. alginolyticus</i> IFO15603 <sup>T</sup>	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>V. proteolyticus</i> ATCC15338 <sup>T</sup>	+	-	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802 <sup>T</sup>	-	+	+	-	-	N	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>V. fluvialis</i> KCTC2573 <sup>T</sup>	+	-	+	-	+	N	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>V. vulnificus</i> ATCC37564 <sup>T</sup>	+	-	+	-	-	N	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-

DP, 2'-hydroxydiphenylether; UR, urea; ML, maltose; IN, inositol; AR, L-arabinose; OF, acid production from glucose; CI, citrate; MN, mannitol; AD, adonitol; GL, glucose; MA, maltose; XY, xylose; CO, p-coumaric; AR, arginine dehydrolase test; AC, acetamine; TD, tryptophane; RA, raffinose; H<sub>2</sub>S, hydrogen sulfide test; LY, lysine dehydrogenase test; ES, eculine; PX, polymyxin B test; SO, sorbitol; ON, O-nitrophenyl-β-D-galatopyranoside; ORN, ornithine decarboxylase test; PL, inoxyl-β-D-glucoside; LA, lactose; SU, sucrose; RH, rhamnose; OX, oxidase; N, not determined; IFO, Institute for Fermentation, Osaka; KCTC, Korean Collection for Type Cultures; ATCC, American Type Culture Collection; IMSNU, Institute of Microbiology Seoul National University

를 사용하였다. MR 배지에 18~24 시간 충분히 키운 균주를 생리식염수 용액에 현탁하여 그람음성용 GNI card에 주입하여 4~15 시간 배양한 후 결과는 컴퓨터 프로그램에 의해 자동적으로 저장하여 동정하였다. 신뢰도 70% 이상을 올바른 동정으로 판정하였다.

2 회 계대배양 후 Miller의 방법(1)에 따라 수행하였다. 결과는 Software Version TSBA 2.11로 분석하였으며, 유사도 0.5~0.9를 신뢰성 있는 동정 결과로 판정하였다.

**결 과**

**MIDI를 이용한 FAMES 분석**

FAMES (Fatty Acid Methyl Esters) 분석은 TSBA (Trypticase Soy Broth Agar, Difco, Detroit, USA) 배지에 30°C에서 24 시간,

**균주의 형태 및 생리·생화학적 특성**

본 실험에 이용된 분리 균주들은 MR 배지에서 대부분 크림색의 집락을 형성하였으며 그람음성, 간균, 통성 혐기성세균으로

**Table 2.** Comparison of identification results by Vitek and MIDI systems

Strains	Vitek	MIDI
TL1-1	<i>V. alginolyticus</i>	UN <sup>a</sup>
TL4-1	UN	<i>V. proteolyticus</i>
TL6	<i>V. alginolyticus</i>	UN
TL7-2	<i>V. alginolyticus</i>	UN
TL12	UN	UN
TL15	<i>V. alginolyticus</i>	UN
TL19	UN	<i>V. fluvialis</i>
TL21-1	UN	<i>V. metschnikovii</i>
TL21-2	<i>V. cholerae</i> non-O1	UN
TL23	<i>V. alginolyticus</i>	UN
TL27	<i>V. alginolyticus</i>	UN
TL33	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
TL36-2	<i>V. cholerae</i> non-O1	UN
TL43	<i>V. parahaemolyticus</i>	UN
TL50-3	<i>V. cholerae</i> non-O1	<i>V. alginolyticus</i>
TL56	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. metschnikovii</i>
TL57-1	UN	UN
TL57-2	<i>V. alginolyticus</i>	UN
TL74	<i>V. alginolyticus</i>	UN
TL78-2	<i>V. alginolyticus</i>	UN
TL78-3	<i>V. cholerae</i> non-O1	UN

<sup>a</sup>UN, unidentified

catalase 양성이며, 운동성을 나타내었다. 대부분의 균주들이 0%-10% NaCl에서 성장하였으며, 최적성장 NaCl 농도는 3%였다.

#### Vitek system을 이용한 동정

당 이용능, 기질가수분해능 등 총 29가지의 생화학적 반응에 의한 동정 시스템인 Vitek을 이용한 결과(Table 1), 모든 분리 균주가 glucose, mannitol, maltose를 이용하며, sorbitol과 rhamnose를 이용하지 못하였다. 표준균주의 동정은 *V. alginolyticus* IFO15630<sup>T</sup>, *V. proteolyticus* ATCC15338<sup>T</sup>, *V. parahaemolyticus* ATCC17802<sup>T</sup>, *V. fluvialis* KCTC2573<sup>T</sup>, *V. vulnificus* ATCC37564<sup>T</sup> 모두 신뢰도 90% 이상을 나타내어 정확히 동정되었다. 실험에 이용한 21 균주 중 11 균주(TL1-1, TL6, TL7-2, TL15, TL23, TL27, TL33, TL56, TL57-2, TL74, TL78-2)가 *Vibrio alginolyticus*로, 4 균주(TL21-2, TL36-2, TL50-3, TL78-3)가 *Vibrio cholerae* non-O1로, 1 균주(TL43)가 *Vibrio parahaemolyticus*로 동정되어, 총 21 균주 중 16 균주가 종(species) 수준에서 동정되었다. 동정이 되지 않은 균주는 7 균주(TL4-1, TL12, TL19, TL21-1, TL57-1)였다(Table 2).

#### MIDI에 의한 FAMES 분석 및 동정

본 실험에서 측정된 *Vibrio* 속 세균과 표준 균주들의 주요 지

방산은 포화지방산으로 16:0이었다(Table 3).

MIDI에 의해 동정된 vibrio 세균은 21 균주 중 6 균주 뿐이었다. MIDI에 의해 동정한 경우, Vitek에 의해 *V. alginolyticus*로 동정되었던 11 균주 중 TL56은 *V. metschnikovii*로 동정되었고 나머지 10 균주는 미동정되었다. Vitek에 의해 *V. cholerae* non-O1으로 동정된 4 균주 중 TL50-3 한 균주만이 *V. alginolyticus*로 동정되었다.

한편 Vitek에서 동정되지 않은 5 균주 중 TL4-1, TL19, TL21-1은 *V. proteolyticus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*으로 각각 동정되었다. MIDI에 의한 동정 결과는 1 균주(TL33)을 제외한 모든 균주에서 Vitek의 동정 결과와 상이하였으며, 두 시스템 모두에서 종 수준까지 동정된 3 균주 중 2 균주(TL50-3, TL56)는 서로 다른 동정 결과를 나타내었다(Table 2).

## 고 찰

Vitek을 이용한 경우, 분리한 총 21 균주 중 동정된 균주는 16 균주로 전체의 76%였으며, 동정되지 못한 균주는 5 균주로 24%였다. 반면 MIDI에 의해 동정한 경우 총 21 균주 중 6 균주만이 동정되어 29%의 매우 낮은 동정율을 나타냈다(Table 4).

MIDI를 이용한 *Vibrio*의 동정은 동정율이 매우 낮으며 MIDI에 의한 표준균주의 동정은 5 균주 중 2 균주(*V. proteolyticus* ATCC15338<sup>T</sup>, *V. vulnificus* ATCC37564<sup>T</sup>)만이 *Vibrio* 속으로 동정되었으며, 3 균주는 미동정의 결과를 나타냈다. 따라서 MIDI를 이용한 해양 유래의 *Vibrio* 속 세균의 동정은 문제점이 있는 것으로 파악되며, Vitek과 동일한 동정 결과는 TL33 (*V. alginolyticus*) 단 1 건으로 Vitek의 결과와 많은 차이를 나타내고 있다. *Vibrio* 속 세균의 동정에는 MIDI에 비해 Vitek시스템이 더 유용한 것으로 사료된다.

자연계로부터 분리한 세균을 자동화 동정 시스템에 의해 동정할 경우, data base에 없는 세균 종(species)이기 때문에 미 동정되는 경우가 많다. 즉 각 시스템의 data base의 내용에 따라 동정에 많은 제한을 받는다고 볼 수 있다. Vitek 시스템의 data base는 800 종으로 MIDI의 2,400 종에 비해 data base의 크기는 작으나 주로 병원성 세균의 동정에 적합하도록 되어 있어(5), MIDI 시스템에 비해 Vitek 시스템에 의한 *Vibrio* 속 세균의 동정율이 더 높은 것으로 추정된다.

MIDI 시스템은 현재의 미생물 자동화 동정 시스템 중 가장 큰 data base가 구축되어 있으나, 해양으로부터 분리하여 본 실험에 사용한 *Vibrio* 속 세균의 동정의 경우 동정율이 매우 낮았다. 이는 자동화 동정 기기에 의한 미생물 동정의 한계성을 나타내는 것이라고 볼 수 있으며, 자동화 동정 기기 사용 시 이러한 한계성에 유의하여 동정의 결과를 판단하는 것이 매우 중요하다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2001-1-20200-006-1) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

**Table 3.** Cellular fatty acid compositions (mol%) of *Vibrio* isolates and type strains

strains	12:0	12:0 3OH	14:0	15:0	16:0 ISO	16:0	17:1 w8c	17:0	18:0
TL1-1	3	3	5	2	1	15	2	2	1
TL4-1	3	3	5	0	0	17	0	0	2
TL6	3	4	6	2	1	16	2	2	1
TL7-2	3	3	6	2	0	14	2	2	2
TL12	3	3	5	2	1	13	3	2	3
TL15	5	4	1	2	0	11	2	2	0
TL19	3	3	5	1	0	18	1	1	1
TL21-1	4	2	5	0	0	18	0	0	2
TL21-2	3	0	6	2	2	15	2	2	1
TL23	2	3	5	1	6	13	2	1	1
TL27	1	1	9	5	6	29	8	1	1
TL33	4	4	6	0	0	16	0	0	1
TL36-2	4	2	5	1	5	17	0	1	1
TL43	3	11	5	2	2	14	2	2	2
TL50-3	4	4	7	0	1	10	0	0	1
TL56	4	3	6	1	0	17	0	1	1
TL57-1	3	0	6	1	0	16	0	1	1
TL57-2	0	0	0	1	0	10	0	2	6
TL74	3	1	3	3	1	22	7	4	1
TL78-2	3	3	5	2	1	14	2	2	1
TL78-3	3	3	5	2	2	13	2	2	1
<i>V. alginolyticus</i> IFO15603 <sup>T</sup>	0	0	2	0	2	5	0	0.6	13
<i>V. proteolyticus</i> ATCC15338 <sup>T</sup>	0	0	0	0	0	24	0	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802 <sup>T</sup>	4	0	7	3	0	27	0	0	1
<i>V. fluvialis</i> KCTC2573 <sup>T</sup>	5	0	7	3	0	23	0	0	1
<i>V. vulnificus</i> ATCC37564 <sup>T</sup>	0.3	0	2.6	0	1	16	1.2	0.5	0.3

12:0, dodecanoic acid; 12:0 3OH, 3-hydroxydodecanoic acid; 14:0, tetradecanoic acid; 15:0, pentadecanoic acid; 16:0 ISO, 14-methylpentadecanoic acid; 16:0, hexadecanoic acid; 17:1 w8c, cis-9-heptadecanoic acid; 17:0, heptadecanoic acid; 18:0, octadecanoic acid; ND, not determined; IFO, Institute for Fermentation, Osaka; KCTC, Korean Collection for Type Cultures; ATCC, American Type Culture Collection; IMSNU, Institute of Microbiology Seoul National University.

**Table 4.** Automated systems for identification of *Vibrio* species

	No. matched (%) by indicated test	
	Vitek	MIDI
identified	16(76%)	6(29%)
<i>V. alginolyticus</i>	11	2
<i>V. cholerae non-O1</i>	4	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	1	0
<i>V. proteolyticus</i>	0	1
<i>V. fluvialis</i>	0	1
<i>V. metschnikovii</i>	0	2
unidentified	5	15
No. tested	21	21

## 참고문헌

- Gerhardt P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, W.A. Wood, N.R. Kring, E.W. Nester, and G.B. Philips(eds.). 1981. Manual of methods for general Bacteriology. ASM.
- Guido F., D. Monnet, C. deBernardis, A. Graevenitz, and J. Freney. 1998. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant Gram-negative rods. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1948-1952.
- Jill K.W., G. Hanko, R. Stewart, J. Pape, and I. Nachamkin. 1999. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1967-1970.
- Miller L.T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol.* 16, 584-586.

5. O'Hara C.M., G.L. Westbrook, and J.M. Miller. 1997. Evaluation of Vitek GNI+ and Becton Dickinson Microbiology Systems Crystal E/NF identification systems for identification of members of the family Enterobacteriaceae and other gram-negative, glucose-fermenting and non-glucose-fermenting bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3269-3273.
6. Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1981. General characterization, p. 409-443. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips(ed.), Manual of methods for general bacteriology. Am. Soc. Microbiol, Washington, D.C.
7. Stager C.E. and J.R. Davis. 1992. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 302-327.
8. Tang Y.-W. , N. M. Ellis, M. K. Hopkins, D. H. Smith, D. E. Dodge, and D. H. Persing. 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic Gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3674-3679.

(Received May 27, 2002/Accepted June 14, 2002)

---

**ABSTRACT: Comparison of Automated Systems for Identification of *Vibrio* Species**

**Ju-Lee Kown and Jin-Sook Park** (Department of Microbiology, Hannam University, Deajon 300-791, Korea)

Twenty one *Vibrio* strains were isolated from costal water and their phenotypic properties were determined. We identified bacterial isolates by using automated identification systems, Vitek and MIDI, and compared their identification results with each other. The comparison of them provided identical species information for only one isolates, TL33(*V. alginolyticus*). From Vitek and MIDI, 16 (76%), and 6 (29%) out of 21 isolates were identified to the species level, respectively. Vitek was more useful than MIDI for identification of *Vibrio* species.