



새우에서 분리된 *Vibrio* species 동정을 위한 VITEK 2 system 방법과 species-specific PCR 방법 비교 평가

이정민 · 이원준 · 김민주 · 조용선¹ · 이진성² · 이현진³ · 윤상우³ · 김근성*

중앙대학교 식품공학과, ¹한국식품연구원 식품분석센터, ²경기대학교 생명과학과, ³(주)디에스라인 기업부설연구소

Comparative Evaluation of the VITEK 2 System and Species-specific PCR Methods for the Detection of *Vibrio* Species Isolated from Shrimp

Jeong-Min Lee, Won-Jun Lee, Min-Ju Kim, Yong-Sun Cho¹, Jin-Sung Lee²,
Hyun-Jin Lee³, Sang-Woo Yoon³, and Keun-Sung Kim*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

¹Food Analysis Center, Korea Food Research Institute

²Department of Biological Sciences, Kyonggi University

³Research and Development Center, DSLine Co., Ltd.

(Received June 5, 2015/Revised July 10, 2015/Accepted July 17, 2015)

ABSTRACT - *Vibrio* is a genus of Gram-negative, curved, halophilic, and non-spore-forming bacteria. Some of the *Vibrio* species, such as *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus*, often contaminate seafood products and occasionally cause human diseases when the seafood products are ingested. A total of 24 *Vibrio* strains were isolated from shrimp samples on Thiosulphate citrate bile salt sucrose (TCBS) media in this study. All of the 24 isolates were confirmed to belong to the genus *Vibrio* by using 16S rRNA gene sequence analyses. Vitek 2 system and species-specific polymerase chain reaction (PCR) methods were used to further identify a total of 29 *Vibrio* strains at the species level, including the 24 shrimp *Vibrio* isolates and five *Vibrio* reference strains. The specificities of the two methods to identify *Vibrio* strains at the species level were compared in this study. The species-specific PCR method was designed to detect five different *Vibrio* species, such as *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, and *Vibrio mimicus*. From the 24 *Vibrio* shrimp isolates, the Vitek 2 system method could identify 15 (62.5%) strains as *Vibrio* species and 7 (29.2%) strains as non-*Vibrio* species, but could not identify the rest 2 (8.3%) strains. But species-specific PCR method could identify 16 (66.7%) strains as *Vibrio* species and could not identify the rest 8 (33.3%) strains. Among the 24 *Vibrio* shrimp strains, these two methods could unanimously identify 7 (7/24, 29.2%) strains (2 *V. parahaemolyticus*, 4 *V. alginolyticus*, and 1 *V. mimicus*). Considering that such different identification results were obtained using the two different methods in this study, identification method for *Vibrio* species must be carefully chosen.

Key words: Vitek 2 system, species-specific PCR, *Vibrio* species, identification

Vibrio 속은 그람 음성, 호염성 간균으로 해수, 기수, 담수 지역 등 해양환경에 널리 분포한다¹⁾. 또한, *Vibrio* 속 중의 일부 종은 사람에게 치명적인 병원균으로 작용하며, 콜레라균(*Vibrio cholerae*), 장염비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*), 그리고 패혈증균(*Vibrio vulnificus*) 등의 병

원성 세균이 포함된다²⁾. 특히 장염비브리오균(*V. parahaemolyticus*)은 여름철에 일본 및 동남아시아와 더불어 국내에서 해산물 식품에 오염되어 빈번하게 식중독을 일으킨다^{3,4)}. 특히 국내에서는 *Vibrio* 속에 의한 식중독은 주로 수온이 높은 여름철에 어패류나 갑각류 등의 해산물을 날 것으로 혹은 부적절하게 조리하여 섭취하는 경우에 발생하며, 또한 조리기구 및 해산물과 함께 조리하는 경우에 채소류 등에 교차오염 되는 경우도 있다^{5,6)}. 국내의 경우 해산물에서 *Vibrio* 속의 오염도와 식중독 발생율은 살모넬라, 황색포도상구균 등과 함께 매우 높은 수준으로 알려

*Correspondence to: Keun-Sung Kim, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, 72-1, Ansong, Gyunggi 456-756, Korea

Tel: 82-31-670-3032, Fax: 82-31-675-4853

E-mail: keunsung@cau.ac.kr

져 있다⁷⁾. 광어나 우럭, 굴 등의 어패류를 날것으로 섭취하는 한국인의 특성을 고려할 때, 이러한 해산물에 대한 빠르고 정확한 *Vibrio* 검출기술은 식품위생 및 공중보건의 측면에서 매우 중요하다.

현재 *Vibrio* 속 세균을 검출하기 위하여 일반적으로 *Vibrio* 선택배지인 Thiosulphate citrate bile salt sucrose (TCBS) 배지를 사용하고 있다⁸⁾. 그러나 이와 같은 배지배양법은 증균배양, 선택배양, 생화학적 동정 확인시험을 포함하여 5-7일 정도의 긴 기간이 소요되고 노동력의 소모가 많으며 배양조건에 따라 혹은 실험자에 따라 결과의 판정이 달라지는 어려움이 있다. 게다가 실제 병원성이 있는 *Vibrio* 종을 검출하기 위해서는 추가적인 확인시험이 필요하다. 따라서 이러한 단점을 보완할 수 있는 신속검출기법이 현재까지 지속적으로 개발되어지고 있으며 실제로 많은 새로운 검출방법들이 소개되었다⁹⁾.

미생물의 기질 분해능을 근거로 하여 동정하는 Vitek 2 system 방법은 컴퓨터 프로그램을 이용하여 결과를 분석하고, 이미 보유하고 있는 data base와 비교하여 동정하는 방식이다^{10,11)}. 이러한 미생물 동정 시스템 방법은 실험자의 주관적인 견해를 배제하고 소요시간을 줄여 준다는 장점이 있으나, 미생물의 동정을 표현형적 특징에만 의존하여 수행하기 때문에 정확한 동정 결과를 얻을 수 없다는 단점이 있다¹²⁾. 하지만 분리균주의 동정에 대한 Vitek 2 system 방법의 유용성이 정확하게 밝혀지지 않은 실정임에도 불구하고 현재 미생물 동정실험에 널리 사용되고 있어 Vitek 2 system 방법에 대한 평가가 요구된다¹³⁾.

한편 실험과정이 매우 간단하고 신속하며 적은 양의 DNA만으로도 동정이 가능하기 때문에 세균 종(species)의 동정, 역학조사 등 세균의 분류학적 연구에 이용되고 있는 species-specific polymerase chain reaction (PCR) 방법은 특정 유전자의 증폭이 용이해지면서 널리 수행되고 있는 연구방법이다¹⁴⁾. 또한 species-specific PCR 방법은 사용되는 primer 종류에 따라 세균의 속(genus)과 종(species)의 구분이 가능하며, 높은 재현성을 나타내는 것으로 알려져 있다^{15,16)}. 그러나 종의 구분에 있어 변별력이 낮은 것으로 평가되는 경우도 있다¹⁷⁾.

그러므로 본 연구에서는 해산물에서 가장 빈번하게 검출되는 세균인 *Vibrio* 종(species)을 대상으로 하여 생화학적 방법인 Vitek 2 system 방법과 분자생물학적 방법인 species-specific PCR 방법의 동정결과를 비교·평가하고자 하였다.

Materials and Methods

Vibrio 표준균주

본 연구에서는 5종의 *Vibrio* 표준균주가 이용되었다. *V. parahaemolyticus* ATCC 27969, *V. vulnificus* ATCC 27562,

V. mimicus ATCC 33653, *V. alginolyticus* ATCC 17749는 American Type Culture Collection (ATCC)로 부터 분양 받았으며, *V. cholerae* NIH 35A3은 미국국립보건원(National Institutes of Health, NIH)으로 부터 분양 받았다.

Vibrio 분리균주

본 연구에서 이용된 *Vibrio* 분리균주는 강화, 남양, 인천, 홍성, 그리고 태안 지역에서 확보한 새우로부터 분리되었다. 수집한 각 원산지 별 새우 검체 150 g을 균질화 시킨 후 각 검체를 멸균희석액(0.85% NaCl)으로 10진 희석법에 따라 계열희석 하였다. 각 검체의 희석액을 Thiosulphate citrate bile salt sucrose (TCBS, Difco, Becton Dickinson Co., Sparks, MD, USA) 배지를 이용하여 37°C에서 24시간 배양하여 운동성이 있고, yellow나 green color를 띠는 colony를 *Vibrio* 속 세균으로 순수분리 하였다.

16S rRNA gene sequencing

새우로부터 분리된 분리균주는 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, Becton Dickinson Co., Sparks, MD, USA) 배지에 희석도말하여 37°C에서 24시간 배양 하였다. 배양된 집락 중 단일 집락을 선택하여 1.5% NaCl이 포함된 Brain Heart Infusion (BHI, Difco, Becton Dickinson Co., Sparks, MD, USA) broth에 증균배양 하였다. 증균배양 후 다음과 같이 boiling method를 이용하여 배양액으로부터 genomic DNA를 추출하였다. 배양액 1 mL를 14,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, cell pellet을 확보하였다. Cell pellet에 멸균수 1 mL을 첨가한 후 100°C에서 10분간 가열하였다. 가열 후 2분간 상온에 방치한 후 14,000 rpm으로 3분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 template DNA로 사용하였다.

Vibrio 선택배지를 이용하여 분리된 새우 분리균주의 속명을 확인하기 위하여 16S rRNA gene primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응액은 forward primer와 reverse primer (100 pmole/1 µL) 각각 2 µL, 2 × Taq PCR Smart Mix (Solgent Co., Daejeon, South Korea) 20 µL, 그리고 template DNA는 26 µL로 총량은 50 µL로 하였다. PCR은 Gene Pro Thermal Cycler TC-E-48D (Hangzhou Bioer Technology, Binjiang, China)를 사용하여 수행하였다. 본 실험에 이용된 16S rRNA gene primer 염기서열과 반응조건은 Table 1에 나타내었다. PCR을 수행한 후 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동 한 후 SL-20 High Performance DNA image visualizer (Seoulin Scientific Co. Ltd., Seongnam, South Korea)로 target band를 확인하였다. 또한 16S rRNA gene PCR 증폭산물에 대하여 DNA sequencing을 수행하였다. 16S rRNA gene의 sequencing은 dideoxynucleotide-chain-terminating DNA sequencing 원리를 기초로 하는 ABI 3730XL DNA Analyzer를 이용하였

Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) primers and amplification conditions used in this study

species	Target genes	Primer names	Primer sequences (5'-3')	Amplification conditions ¹⁾			Products (bp)	Reference
				D	A	E		
Universal primers	16S ribosomal RNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	95°C, 30s	45°C, 30s	72°C, 1m	881	Thwe et al. (2011)
		907B	CCGTCAATTCMTTTRAGITT					
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>flaE</i> gene	Vp.flae-79F	GCAGCTGATCAAAACGTTGAGT	94°C, 30s	50°C, 30s	72°C, 1m	897	Cheryl et al. (2007)
		Vp.flae-934R	ATTATCGATCGTGCCACTCAC					
<i>V. alginolyticus</i>	<i>colG</i> gene	VA-F	CGAGTACAGTCACTTGAAAGCC	94°C, 30s	55°C, 30s	72°C, 1m	737	Angela et al. (2005)
		VA-R	CACAACAGAACTCGCGTTACC					
<i>V. vulnificus</i>	<i>hsp</i> gene	Vv.hsp-326F	GTCTTAAAGCGGTTGCTGC	94°C, 30s	55°C, 30s	72°C, 1m	410	Cheryl et al. (2007)
		Vv.hsp-697R	CGCTTCAAGTGCTGGTAGAAG					
<i>V. mimicus</i>	<i>sodB</i> gene	Vm.sodB-F	CATTCGGTTCCTTCGCTGAT	94°C, 30s	50°C, 30s	72°C, 1m	121	Cheryl et al. (2007)
		Vm.sodB-R2	GAAGTGTTAGTGATTGCTAGAGAT					
<i>V. cholerae</i>	<i>sodB</i> gene	Vc.sodB-F	AAGACCTCAACTGGCGGTA	94°C, 30s	55°C, 30s	72°C, 1m	248	Cheryl et al. (2007)
		Vc.sodB-R	GAAGTGTTAGTGATCGCCAGAGT					

¹⁾D : denaturation; A : annealing; E : extension

다. Sequencing을 통하여 확보한 16S rRNA gene 염기서열은 GenBank상의 basic local alignment search tool (BLAST) 프로그램을 이용하여 이미 GenBank에 등록된 16S rRNA gene 염기서열과의 상동성을 비교 분석하였다.

Vitek 2 system 방법을 이용한 *Vibrio* 균의 동정

본 연구에서는 5개의 *Vibrio* 표준균주와 TCBS 배지상에서 분리된 123개 *Vibrio* 의심 분리균주 중 16S rRNA gene sequencing 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 24개의 분리균주를 대상으로 비교실험을 진행하였다. 균주는 3% NaCl 이 포함된 Nutrient agar (Merck, Darmstadt, Germany) 배지에 2회 계대 배양을 하여 활성화하였다. 활성화된 균주는 0.45% NaCl 용액을 사용하여 densi-check에서 0.5 McFarland로 희석을 한 후 GNI card에 분주하여 Vitek 2 system (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)으로 분석을 수행하였다. 결과 판독은 Advanced Expert System (AES) software에 의해 자동으로 분석 및 판독하여 동정하였다. 판독결과 신뢰도 90% 이상을 올바른 동정으로 판정하였다.

Species-specific PCR 방법을 이용한 *Vibrio* 균의 동정

본 연구에 이용된 5개의 *Vibrio* 표준균주와 TCBS 배지상에서 분리된 123개 *Vibrio* 의심 분리균주 중 16S rRNA gene sequencing을 이용한 동정 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 24개에 대하여 5개 species 별로 각 *Vibrio* species에 특이적인 primer를 이용하여 species-specific PCR을 수행하였다. PCR 반응액은 forward primer와 reverse primer (100 pmole/μL) 각각 2 μL, 2 × Taq PCR Smart Mix (Solgent Co., Daejeon, South Korea) 20 μL, 그리고 template DNA는 26 μL 로 총량은 50 μL 로 하였다. PCR

은 Gene Pro Thermal Cycler TC-E-48D (Hangzhou Bioer Technology, Binjiang, China)를 사용하여 수행하였다. PCR을 수행한 후 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동 한 후 SL-20 High Performance DNA image visualizer (Seoulin Scientific Co. Ltd., Seongnam, South Korea)로 target band를 확인하였다. *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* 그리고 *V. cholerae* 각각의 species-specific primer들의 염기서열과 PCR 반응조건은 Table 1에 나타내었다.

Results

Vibrio 속의 분리

Vibrio 선택배지인 TCBS 배지상에 형성된 colony 중 yellow와 green 색을 띠는 colony를 *Vibrio* 속 세균으로 판정하고 순수 분리하였다. 그 결과 총 750 g의 새우 검체(5개 원산지로부터 각 원산지 별로 150 g씩 확보된 새우 검체)로부터 *Vibrio* 의심균주 123개를 확보하였다.

16S rRNA gene sequencing

총 123개 새우 분리균주를 대상으로 16S rRNA gene sequencing을 수행하였다. 16S rRNA gene sequencing을 통하여 확보된 분리균주의 16S rRNA gene 염기서열을 대상으로 하여 Blast 검색하여 GeneBank상의 data와 비교 분석하였다. 16S rRNA gene sequencing 분석결과, 총 123개 새우 분리균주 중 24개(19.5%) 분리균주가 *Vibrio* 속에 속하는 것으로 확인되었다. 16S rRNA gene sequencing 결과에 의하여 최종적으로 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 24개는 Vitek 2 system 방법과 species-specific PCR 방법

Table 2. Identification of *Vibrio* reference strains and isolates from shrimp using Vitek 2 system

strains	Identification results		Note
	Species	Probability	
Reference strains			
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 27969	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99%	
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	-	-	unidentified
<i>V. cholerae</i> NIH 35A3	-	-	unidentified
<i>V. mimicus</i> ATCC 33653	<i>Vibrio mimicus</i>	96%	
<i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749	-	-	unidentified
Isolates			
VNA3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99%	
VNB1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99%	
VNB2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	95%	
VNC1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	95%	
V-117	<i>Vibrio vulnificus</i>	99%	
B-5	<i>Vibrio vulnificus</i>	99%	
B-6	<i>Vibrio vulnificus</i>	99%	
B-7	<i>Vibrio vulnificus</i>	99%	
B-8	<i>Vibrio vulnificus</i>	99%	
V-35653	<i>Vibrio mimicus</i>	99%	
VGA1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	96%	
VGE1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99%	
VGf1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	94%	
VNA1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	98%	
VTA1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99%	
VGB2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	88%	
VGd1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	93%	
VGf2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	94%	
VGH1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	89%	
VGJ1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	89%	
VND1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	94%	
VGC1	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	95%	
VTB1	-	-	unidentified
VTB2	-	-	unidentified

을 이용한 species 수준의 동정실험에 이용되었다.

Vitek 2 system 방법을 이용한 *Vibrio* 균의 동정

Vibrio 표준균주 5개와 16S rRNA gene sequencing 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 24개를 대상으로 Vitek 2 system 방법에 의하여 분석을 수행하였으며 분석결과는 Table 2에 나타내었다. 5개 *Vibrio* 표준균주 중 *V. parahaemolyticus* ATCC 27969와 *V. mimicus* ATCC 33653는 probability가 각각 99%와 96%로 예상했던 결과와 일치하였다. 그러나 나머지 3개의 표준균주(*V. vulnificus* ATCC 27562, *V. cholerae* NIH 35A3, *V. alginolyticus* ATCC 17749)는 동정이 되지 않았다. 16S rRNA gene sequencing 결과에 의하여 *Vibrio* 속으로 동정되었던 24개의 분리균주 중 15개가 Vitek 2 system 방법에 의한 분석을 통하여 *Vibrio* species 수준으로 동정되었다. 나머지 9개의 분리균주 중 6개 분리균주는 *Sphingomonas paucimobilis*로 동정

되었고, 1개 분리균주는 *Acinetobacter haemolyticus*로 동정되었으며, 나머지 2개의 분리균주는 동정되지 않았다.

Vibrio species-specific PCR 방법을 이용한 *Vibrio* 균의 동정

Vibrio 표준균주 5개와 16S rRNA gene sequencing 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 24개를 대상으로 species-specific PCR을 수행한 결과, 5개의 *Vibrio* 표준균주에서 각각 *Vibrio* species에 해당하는 target band가 확인되었다. 위의 결과로 보아 각 *Vibrio* species-specific primer가 각각의 *Vibrio* species에 특이적으로 반응한다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 16S rRNA gene sequencing 결과에 의하여 *Vibrio* 속으로 동정되었던 24개의 분리균주 중 16개 분리균주는 species-specific PCR 방법을 통하여 *Vibrio* species 수준으로 동정되었고, 나머지 8개 분리균주는 동정되지 않았다. 각 species-specific primer를 이용하여 PCR

Table 3. Identification of *Vibrio* reference strains and isolates using species-specific PCR

strains	species-specific primers ¹⁾				
	Vp	Vv	Vc	Vm	Va
Reference strains					
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 27969	+ ²⁾	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	-	+	-	-	-
<i>V. cholerae</i> NIH 35A3	-	-	+	-	-
<i>V. mimicus</i> ATCC 33653	-	-	-	+	-
<i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749	-	-	-	-	+
Isolates					
VNB1	+	-	-	-	-
VNB2	+	-	-	-	-
VTB1	+	-	-	-	-
VTB2	+	-	-	-	-
V-117	+	-	-	-	-
B-5	+	-	-	-	-
B-6	+	-	-	-	-
B-7	+	-	-	-	-
B-8	+	-	-	-	-
VGA1	-	-	-	+	-
V-35653	-	-	-	+	-
VGE1	-	-	-	-	+
VGF1	-	-	-	-	+
VNA1	-	-	-	-	+
VND1	-	-	-	-	+
VTA1	-	-	-	-	+
VGB2	-	-	-	-	-
VGC1	-	-	-	-	-
VGD1	-	-	-	-	-
VGF2	-	-	-	-	-
VGH1	-	-	-	-	-
VGJ1	-	-	-	-	-
VNA3	-	-	-	-	-
VNC1	-	-	-	-	-

¹⁾Vp : *Vibrio parahaemolyticus* species-specific primers (Vp.fluE-79F, Vp.fluE-934R); Vv : *Vibrio vulnificus* species specific primers (Vv.hsp-326F, Vv.hsp-697R); Vc : *Vibrio cholerae* species-specific primers (Vc.sodB-F, Vc.sodB-R); Vm : *Vibrio mimicus* species-specific primers (Vm.sodB-F, Vm.sodB-R2); Va : *Vibrio alginolyticus* species-specific primers (VA-F, VA-R)

²⁾Data were presented as positive (+) and negative (-) PCR amplifications.

을 수행한 결과는 Table 3에 나타내었다.

Discussion

본 연구에서는 해산물에서 가장 빈번하게 검출되는 세균인 *Vibrio* 속을 대상으로 하여 생화학적 방법인 Vitek 2 system 방법과 분자생물학적 방법인 species-specific PCR 방법의 동정결과를 비교·평가하고자 하였다. 그리고 이들 2개의 다른 방법을 사용하여 얻은 동정결과를 Table 4

에 비교하여 나타내었다.

Vitek 2 system 방법을 이용한 경우, *Vibrio* 표준균주 2개(2/5, 40%), 16S rRNA gene sequencing 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 15개(15/24, 62.5%) 등의 총 17개 균주(17/29, 58.6%)가 *Vibrio* 종으로 동정되었으며, 나머지 12개 균주(12/29, 41.4%)는 *Vibrio* 종으로 동정이 되지 않았다.

Species-specific PCR 방법을 이용한 경우, *Vibrio* 표준균주 5개(5/5, 100%) 모두 *Vibrio* 종으로 동정이 되었으며, 16S rRNA gene sequencing 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 24개 중 16개(16/24, 66.7%)도 *Vibrio* 종으로 동정이 되어서 총 21개 균주(21/29, 72.5%)가 *Vibrio* 종으로 동정되었으며, 나머지 8개 균주(8/29, 27.5%)는 *Vibrio* 종으로 동정이 되지 않았다.

이와 같은 현상은 현재 다양한 생화학적 방법을 통한 종 수준의 동정결과가 종간(interspecies) 혹은 동일 종내(intraspecies) 에서도 다양한 결과를 나타내어 정확한 동정을 불가능하게 하기 때문에 기인된 것으로 사료된다. Yoon 등¹⁸⁾은 103개의 *V. vulnificus* 균주가 Vitek 2 GNI+card에 의해 24종류의 bionumber로 구분되었고, Ryang 등¹⁹⁾의 연구에서는 *V. vulnificus* 23개 균주를 대상으로 생화학적 방법인 pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 방법을 사용하여 분석한 결과, 유전학적으로 매우 다양하다고 하였다. 또 다른 측면에서 고찰한 결과에 의하면 자연시료에서 분리되는 *Vibrio* 균의 경우 매우 다양한 생화학적 특성을 보이기 때문에 생화학적인 방법을 사용한 정확한 동정에 많은 문제가 있음이 여러 연구자들에 의해 보고되었다²⁰⁾. 또한 Vitek 2 system 방법에 의해 동정할 경우, data base에 없는 세균 종은 동정되지 않는 경우가 있는 것으로 보고되었다²¹⁾. 즉 Vitek 2 system 방법의 data base의 범위와 내용에 따라 동정에 많은 제한을 받을 것으로 사료된다. 이는 Vitek 2 system 방법에 의한 미생물 동정의 한계성을 나타내는 것이라고 볼 수 있으며, 그에 따라서 Vitek 2 system을 이용한 동정방법은 보다 정확한 data base 구축이 시급하다고 판단 되어진다.

분자생물학적 방법인 species-specific PCR 방법은 *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* 5종에 대한 species-specific primer를 이용하여 신속하고 정확한 동정결과를 얻을 수 있었다. 다만, 16S rRNA gene sequencing 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 24개 중 동정되지 않은 8개 균주는 *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* 종 외에 다른 *Vibrio* species로 사료된다.

그리고 이와 같이 두 가지 방법을 통하여 동정된 결과를 비교하였을 때 일부 상이한 결과를 확인하였다. 표준균주를 포함한 총 29개의 *Vibrio* 균주를 Vitek 2 system 방법과 species-specific PCR 방법으로 각각 동정한 결과,

Table 4. Comparison of species names identified by Vitek 2 system and species-specific PCR

Strains	Species names	
	By Vitek 2 system	By species-specific PCR
Reference strains		
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 27969	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	-	<i>V. vulnificus</i>
<i>V. cholerae</i> NIH 35A3	-	<i>V. cholerae</i>
<i>V. mimicus</i> ATCC 33653	<i>V. mimicus</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749	-	<i>V. alginolyticus</i>
Isolates		
VGA1	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. mimicus</i>
VGB2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-
VGC1	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	-
VGD1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-
VGE1	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
VGF1	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
VGF2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-
VGH1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-
VGJ1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	-
VNA1	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
VNA3	<i>V. parahaemolyticus</i>	-
VNB1	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
VNB2	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
VNC1	<i>V. parahaemolyticus</i>	-
VND1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>V. alginolyticus</i>
VTA1	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
VTB1	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
VTB2	-	<i>V. parahaemolyticus</i>
V-35653	<i>V. mimicus</i>	<i>V. mimicus</i>
V-117	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
B-5	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
B-6	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
B-7	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
B-8	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>

Vibrio 표준균주 2개(2/5, 40%), 16S rRNA gene sequencing 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 7개(7/24, 29.2%) 등의 총 9개(9/29, 31%) 균주들의 동정결과판이 일치하였다. 불일치한 결과 중 대상 미생물의 target gene이 기존 보고된 specific한 gene을 이용하여 문헌상^{22,23)}에 보고 됐던 점과 Vitek 2 system 방법의 부정확성^{24,25)}에 대한 보고를 감안할 때 species-specific PCR 방법이 더 정확하다는 것을 확인 할 수 있었다.

현재 다른 세균 species에 비해 *Vibrio* species에 대한 Vitek 2 system 방법과 species-specific PCR 방법의 연구가 미흡하여 추가실험이 요구된다. 또한 본 연구에서 24개 새우 *Vibrio* 분리균주를 대상으로 하여 Vitek 2 system 방법과 species-specific PCR 방법을 비교하였을 때 결과가 상당부분 불일치하기 때문에 표준균주를 포함하여 좀더 많은 분리균주를 확보하여 추가적인 확인실험을 해야 할 필요성이 있다. 마지막으로 본 연구를 통하여 얻은 연

구결과들은 보다 정확한 *Vibrio* 종(species) 검출방법 개발을 위한 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 2014년도 중소기업청 중소기업기술개발지원 사업에 의해 수행된 것입니다.

국문요약

Vibrio 속에 속한 세균에 의한 식중독은 오염된 해산물 식품의 섭취로 인하여 빈번하게 발생하고 있다. 그러므로 해산물을 날것으로 섭취하는 한국인의 특성을 고려할 때, 빠르고 정확한 *Vibrio* 검출기술은 식품위생 및 공중보건의 측면에서 매우 중요하다. 이와 관련하여 본 연구에서는 전통적인 배지를 이용한 동정방법의 단점을 보완할 수 있는

생화학적 방법인 Vitek 2 system 방법과 분자생물학적 방법인 species-specific PCR 방법을 사용하여 얻은 동정결과를 비교·평가하고자 하였다. 본 연구에서는 5개의 *Vibrio* 표준균주와 16S rRNA gene sequencing 결과에 의하여 *Vibrio* 속으로 확인된 24개의 분리균주가 이용되었다. Vitek 2 system 방법을 이용한 경우, 이와 같이 본 연구에 사용된 29개 균주 중 *Vibrio* 표준균주 2개(2/5, 40%), 16S rRNA gene sequencing 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 15개(15/24, 62.5%) 등의 총 17개 균주(17/29, 58.6%)가 *Vibrio* 종으로 동정되었다. 그리고 species-specific PCR 방법을 이용한 경우, 위의 29개 균주 중 *Vibrio* 표준균주 5개(5/5, 100%), 16S rRNA gene sequencing 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 16개(16/24, 66.7%) 등의 총 21개 균주(21/29, 72.5%)가 *Vibrio* 종으로 동정되었다. Vitek 2 system 방법과 species-specific PCR 방법을 이용하여 동정된 결과를 비교하였을 때 표준균주 중 *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* 등의 2개(2/5, 40%), 새우분리균주 24개 중에서 16S rRNA gene sequencing 결과 *Vibrio* 속으로 확인된 분리균주 7개(7/24, 29.2%) 등의 총 9개(9/29, 31%) 균주들에 대한 동정결과만이 일치하였다.

References

- Kim, S.M., Won, K.M., Woo, S.H., Li, H., Kim, E.J., Choi, K.J., Cho, M.Y., Kim, S.H. and Park, S.I.: Vibrios isolated from diseased marine culturing fishes in Korea. *J. Fish Pathol.* **18**, 133-145 (2005).
- Diggles, B.K., Carson, J., Hine, P.M., Hickman, R.W. and Tait, M.J.: *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand. *Aquaculture* **183**, 1-12 (2000).
- Joseph, S.W., Cowell, R.R. and Kaper, J.B.: *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Crit. Rev. Microbiol.* **10**, 77-123 (1983).
- Su, Y.C. and Liu, C.: *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiol.* **24**, 549-558 (2007).
- Jung, S.H., Hur, M.J., Ju, J.H., Kim, K.A., Oh, S.S., Go, J.M., Kim, Y.H. and Im, J.S.: Microbiological evaluation of raw vegetables. *J. Food Hyg. Safety* **21**, 250-257 (2006).
- Kim, M.H. and Shin, W.S.: Microbiological quality of raw and cooked foods in middle and high school food service establishments. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1343-1356 (2008).
- Korea Food and Drug Administration.: Food & Drug Statistical Yearbook for 2009. Available from http://www.kfda.go.kr/index_kfda?mid=96&pageNo=1&seq=7181&cmd=v, Accessed Nov. 10 (2009).
- Lee, S.K., Wang, H.Z., Law, S.H., Wu, R.S. and Kong, R.Y.: Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. *Marine pollution Bulletin* **44**, 412-420 (2002).
- Chon, J.W., Hyeon, J.Y., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Han, J.A., Chung, Y.H., Song, K.Y. and Seo, K.H.: Comparison of the standard culture method and real-time PCR for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods and vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**, 355-360 (2010).
- Miller, L.T.: Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxyl acids. *J. Clin. Microbiol.* **16**, 584-586 (1982).
- Stager, C.E. and Davis, J.R.: Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 302-327 (1992).
- Jill, K.W., Hanco, G., Stewart, R., Pape, J. and Nachamkin, I.: Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1967-1970 (1999).
- Tang, Y.W., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith, D. H., Dodge, D. E. and Persing, D. H.: Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic Gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 3674-3679 (1998).
- Yeon S.H., Jeong W.J. and Park J.S.: The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *J. Microbiol.* **43**, 1-10 (2005).
- Hernandez, G. and Olmos, J.: Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 722-727 (2003).
- Rivas, R., Garcia-Fraile, P., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E. and Velazquez, E.: *Photobacterium halotolerans* sp. Nov., isolated from lake Martel in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1067-1071 (2003).
- Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C. B. and Swings, J.: Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 5107-5115 (2005).
- Yoon, M., Kim, K.J., Shin, J.H., Seo, S.P. and Yang, D.U.: Identification of *Vibrio vulnificus* by the Vitek GNI+ card. *Korean J. Clin. Pathol.* **20**, 314-319 (2000).
- Ryang, D. W., Koo, S. B., Shin, M. G., Shin, J. H. and Suh, S. P.: Molecular typing of *Vibrio vulnificus* isolated from clinical specimens by pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis. *Jpn. J. Infect. Dis.* **52**, 38-41 (1999).
- Yoon, Y.J., Kim, D.Y., Lee, C.H., Lee, U.Y., Koh, Y.H., Kim, S.K. and Kim, J.W.: Isolation and Identification of *Vibrio* species contaminated in imported frozen seafoods. *J. Fd. Hyg. Safety* **15**, 128-136 (2000).
- O'Hara, C.M., Westbrook, G.L. and Miller, J.M.: 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 (1997).
- Cheryl, L.T., Jayna, S.P., Nancy, D.P., Evangeline, G.S.,

- Cheryl, A.B. and Nancy, A.S.: Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 134 (2007).
23. Angela, D.P., Giuseppina, C., Giuseppina, T., Domenico, C. and Vito, T.F.: A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Prot.* **68**, 150-153 (2005).
24. Lee, S. H., Jang, S. J., Moon, D. S., Park, Y. J., Ahn, G. Y., Han, H. L., Chaulagain, B. P. and Jenog, O. Y.: Evaluation of the detectability of vitek II system for inducible clindamycin resistance in *Staphylococci*. *Kor. J. Lab. Med.* **25**, 406-410 (2005).
25. Eisner, A., Gorkiewicz, G., Feierl, G., Leitner, E., Kofer, J., Kessler, H. H. and Marth, E.: Identification of glycopeptide-resistant *Enterococci* by Vitek 2 system and conventional and real-time polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **53**, 17-21 (2005).
26. Thwe, S. M., Kobayashi, T., Luan, T., Shirai, T., Onodera, M. and Hamada-Sato N.: Isolation, characterization, and utilization of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Myanmar fishery products fermented with boiled rice. *Fisheries Science* **77**, 279-288 (2011).