

# ■ Biolog system을 이용한 세균동정

농업과학기술원 작물보호부 해외병해충과  
- 진 경 식

## 1. 서 론

1876년 Pasteur와 Koch는 동물 탄저병이 세균에 의해서 발생되고, 또한 1878년 Burrill은 사과 및 배나무의 화상병이 세균에 의해 발생하는 것을 밝힌 이후로 현재까지 세균에 대한 많은 연구와 발전을 거듭하여 왔다. 그러나 아직도 세균의 동정 및 분류에 있어서는 논란이 대상이 되고 있으며 계속 되는 동정 방법의 개발로 새로운 세균분류 체계를 확립하고 있다.

Biolog system에 의한 세균의 동정은 세균의 물질대사 성질을 이용하여 개발된 것으로서 95개의 다른 영양 원에 대한 세균의 이용 특성을 Data base화 한 것으로서 기존의 동정체계 보다는 손쉽고 빠르며 많은 Data가 수록되어 있어서 세균동정 체계를 한층 진보시킨 것이라 할 수 있다. Biolog system은 적용 범위가 넓고 사용이 간편해졌다 할지라도 사용자가 지켜야 할 사항을 지키지 않을 경우에는 오류가 생기거나 무용지물에 불과한 것이다. 그러면 Biolog system의 특성, 사용과정 및 지켜야 할 사항들을 기술하면 다음과 같다.

## 2. Biolog system의 일반사항

### (1) 개 요

Biolog system microplate에는 다른 종류의 영양원들의 코팅된 패넬의 well을 용도에 맞게 미리 선택하여 미생물의 이용 또는 산화능력을 측정한다. 각 패넬의 well은 접종된 개체의 metabolic fingerprint를 조성하는 보라색의 특징적인 패턴을 얻을 수 있다. 모든 필요한 영양원과 검정시약은 96 well에 미리 코팅하고 건조시켰으며, tetrazolium violet은 영양원의 이용을 색깔로 나타내기 위한 산화환원 염료로서 이용된다. 검정은 아주 간단하게 수행되는데, 동정하기 위해 분리된 균주는 미리 따뜻하게 만든 멸균된 saline 용액에 현탁하여 특정한 밀도 범위안에 오도록 조정한다. 준비된 현탁액을 각 well당 150 $\mu$ l(GN, GP, ES microplate), 100 $\mu$ l(YT, SF-N, SF-P microplate)씩 분주한다. 각 well에 함유된 chemical은 세균이 호흡활동을 함으로서 산화하고 tetrazolium 염료는 보라색으로 변하게 된다. Microplate를 4시간 또는 24시간 동안 배양하면 세균의 탄소원 이용 패턴을 형성함으로써, 이 패턴을 컴퓨터가 검색하여 동정을 하게된다.

## (2) Biolog 이용시 재료

- Biolog microplates
- 멸균된 saline water (0.85% NaCl), pH 5.5-7.0
- 멸균된 Biolog tube
- 멸균된 면봉
- 멸균된 pipet-tip 및 reservoir
- 8-Channel repeating pipetter
- Turbidimeter
- Turbidity standards
- Incubator (26-35°C)

## (3) Microplate의 종류 및 사용

- GN Microplates : Enterics(장내세균), non-fermenters(비 발효균), fastidious 같은 모든 형태의 그램 음성균 동정에 이용.
- GP Microplates : 그램 양성균, lactic acid 박테리아의 동정에 이용.
- ES Microplates : *Escherichia coli*와 *Salmonella*종을 동정하는데 이용.
- SF-N, SF-P Microplates : *Actinomyces*와 Fungi동정에 이용.

## (4) Microplate의 저장

Microplate의 well속에 들어있는 재료(시약)들의 화학적인 구성은 온도와 광에 민감하기 때문에 Microplate는 은박지 포장속에 넣어서 2-8°C에서 저장되어야만 한다. 그러나 냉동해서는 안된다. Microplate 봉지에 인쇄되어있는 기간 이상 저장하였다 사용하지 말아야 한다.

## (5) Microplate의 기본조성

- 5 polymers
- 28 carbohydrates and derivatives
- 2 methylesters
- 24 carboxylic acids
- 1 brominated chemical
- 3 amides
- 20 amino acids and derivatives
- 4 aromatic chemicals
- 3 amines
- 2 alcohols
- 3 phosphorylated chemicals

### (6) 사용전 주의사항

- 동정을 하려면 반드시 순수 배양해야만 한다.
  - ※ 본 시스템은 혼합된 균주를 동정할 수는 없다.
- 오염은 결과에 영향을 미치므로 사용할 때 오염되지 않도록 주의해야 한다.
- 멸균된 일회용 초자를 사용한다.
  - ※ 세척시 미량의 비누 또는 세제가 남아있으면 결과에 영향을 미친다.
- 사용전에 saline water와 microplates를 미리 따뜻하게 한다.
- Turbidimeter를 유의해서 보정하고, 특정한 밀도범위안에 오도록 현탁액을 준비해야만 한다.
- 검정전에 배양배지 선택에 주의해야 한다.
- 온도, pH, 몰농도 등은 세균의 활력에 영향을 줄 수 있으며, microplate의 반응에도 영향을 줄 수 있다.
- Microplate를 사용하기 전에 제품설명서를 읽을 것을 권한다.

### (7) 수령시 주의사항

- 각 포장이 손상을 입었는지 검사한다.
- 손상된 microplate는 사용할수 없다.
- 각 봉지에 인쇄된 기한만료 날짜를 확인하십시오. 만료후에는 microplates를 사용할 수 없다.

## 3. Biolog 사용과정

### (1) 균주준비

균주는 추천한 배양배지에서 4-18시간 배양하여 생장이 왕성한 균주를 사용한다. 만일 균주 생장이 충분하지 못할 경우 1-2코로니를 재배양하여 사용한다. 균주특성이 천천히 자라는 것은 1개 이상의 샐레에 배양하여 사용한다.

### (2) 재료준비

- Biolog tube에 멸균된 saline water를 18-20ml 채우라.
- 냉장고에서 microplates를 꺼내라.
- 사용전에 모든재료를 실내온도에서 warming up 시켜라.

### (3) 현탁액준비

- Saline water를 채운 tube를 Turbidimeter에 넣고 바늘을 0에 맞춰라.
  - ※ 만약 추천한 tube를 사용하지 않을 경우 광투과에 차이가 날 수 있다.
- 면봉을 saline water에 적신후에 배양기에서 균주를 취하고 혼합기 위에서 현탁액을 만든다. 현탁액은 균덩어리가 없을 때까지 잘 혼합시킨다

- 혼합된 현탁액을 turbidimeter에서 표준용액의 범위가 될 수 있도록 균이나 saline water를 첨가하면서 조정한다.
- 현탁액을 만든 후 바로 microplate에 조심스럽게 분주한다.

#### (4) Microplate에 분주

- Microplate에 균주명과 번호를 기입하라.
- 현탁액을 8-channel pipet reservoir에 붓는다.
- Pipet에 tip을 끼우고 현탁액을 취한다. 이때 pipet에 tip이 잘못 끼워졌을 경우 well에 들어가는 현탁액량이 달라질 수 있으니 확인해야 한다.
- 현탁액을 각 well에 분주하라. 이때 현탁액을 다른 well로 튀지 않도록 주위 해야 한다.

#### (5) 배 양

- Microplate의 뚜껑을 덮고 검정하는 세균의 적절한 환경에서 배양을 해야한다. 일반적으로 28-35℃의 incubator에서 배양하는데, 사람, 가축 또는 식품으로부터 분리한 세균은 35℃에서 식물 및 자연환경에서 분리한 세균은 30℃에서 배양하는 것이 좋다. 자연환경이나 임상 기구에서 분리된 세균은 37℃에서 배양하는 것은 너무 높다.
- Microplate는 뚜껑이 있어서 건조되지 않도록 되어있다. 그러나 microplate의 well주위가 건조되는 것을 최소화시키기 위하여 습도를 유지하여주는 것이 좋다.
- 4-6시간 또는 24시간동안 배양하라.

#### (6) 결과조사 및 해석

- 반응은 육안 또는 기계로 조사할 수 있다. 만일 microplate reader를 사용하여 조사할 때는 반응 조사를 위해 광파장을 590nm에서 조사해야 한다.
- 4시간후 조사는 배양 4시간에서 6시간 사이에 어느 때나 조사할 수 있다. 많은 종의 그램음성균은 4시간에서 조사하는 것이 적당하며 약간의 장내세균종은 24시간 배양하면 조사할 수가 없다. 왜냐하면 이상 양성반응이 생기기 때문이다. 또한 어떤 세균은 24시간 배양해야만 적당한 반응을 나타내기도 한다.
- 24시간 배양했을 때는 자주색이 well의 바닥에 침전되어있는 것도 있다. 이런 현상은 반응을 조사하는데 방해되지는 않지만, 그러나 plate를 육안으로 조사하기 위하여서는 적당한 막대기나 바늘로 내용물을 저어주는 것이 조사에 도움을 주기도 한다.
- 육안조사: MicroLog 1, MicroLog 2, MicroLog 3, 컴퓨터 software를 사용하여 육안조사를 해석할 수가 있다. 각 well의 색의 정도는 음성대조구 well인 A-1에 비교하여 조사한다. A-1 well과 비슷하게 보이는 well은 음성(-)으로 기록하고, A-1과 비교하여 다르게 자주색으로 나타내는 well은 양성(+)으로 기록해야 한다. well색이 아주 미약하거나, 아주 작은 자주색점으로 나타내면 사선(\)으로 기록해야 한다.
- Microplate reader로 조사 : MicroLog 3 컴퓨터 software를 이용하여 자동조사를 할 수 있다. Microplate 뚜껑을 열고 reader의 drawer속에 넣고 590nm의 광파장에 reader를 고정하고 읽는다.

#### (7) 문제점 발생과 대책

만일 Biolog 사용할 때 문제점이 발생한다면 사용설명서를 다시 읽고 시작하라, 그리고 수행과정상에서 빗나간 곳을 찾아라. 세균을 조심스럽게 다룰 것을 명심하라. 환경에 대한 충격(온도, pH, 삼투 물농도, 약품에 대한 충격)을 피하라. 생장이 왕성한 세균을 사용하고, 조심스럽게 이식하고 확실하게 well에 채워라. 다음의 문제점에 대한 대책은 아래와 같다.

● 모든 well이 음성일 경우

- 1) 생장이 왕성한 세균을 사용하라.
- 2) 오래된 균주일 경우 재 배양하여 균의 신선도를 유지하라.
- 3) 사용할 때 일회용 기구를 이용하라. 비록 약간의 비누 찌꺼기라 할지라도 well 반응에 영향을 줄 수 있다.
- 4) 세균현탁액이 충분한지를 재확인하라.
- 5) 배양시 incubator 온도가 너무 높거나 너무 낮았는지를 확인하라.
- 6) Saline water의 삼투몰라리티, pH, 온도가 적당한지를 확인하라.

● 모든 well의 양성일 경우

- 1) 이 microplate에 적당한 균주인지를 확인하라.
- 2) 어떠한 영양원도 현탁액과 함께 혼합되지 못하도록 하라.
- 3) 현탁액의 농도가 너무 높지 않도록 재확인하라.

#### 4. Biolog의 특징

- 1) 결과는 자동으로 해석된다.

종동정은 수초 안에 다음과 같은 정보와 함께 컴퓨터 스크린에 나타난다.

- Biotype형태
- 유사하게 관련된 종의 목록
- 다른 유익한 통계치

- 2) Intelligent software - 다른 색깔/탁도에 대하여 자동으로 보정한다.

눈으로 해석하는 주관성을 제거한다.

- 3) Cluster 분석은 dendograms, 2D-plots, 3-D plots의 형태로 그래픽 출력을 할 수 있다.
- 4) 데이터는 보다 더 많은 분석을 하기 위하여 디스크로 저장할 수 있고, 프린터 출력은 일반적인 형식으로 할 수 있다.
- 5) On-line species 정보는 알려지지 않은 종에 대해 좀더 연구할 수 있도록 한다.
- 6) Software는 유행병학적 또는 다른 목적을 위해 사용자가 데이터베이스를 만들 수 있다.

## 5. Biolog의 적용범위

가. 모든 분야의 미생물학에 적용할 수 있다.

- Clinical (임상)
- Veterinary (축산)
- Food and water (식품 및 음료)
- Fermentation (발효)
- Biotechnology (생명공학)
- Plant pathology (식물병리학)
- Biological control (생물학적 방제)
- Pharmaceutical (제약)
- Environmental (환경)
- Bioremediation (생물학적 변이)
- Soil (토양)
- Marine (해양)
- Contamination ID (미생물 오염확인)
- Ecology (생태학)
- Quality control (품질)
- Research (연구)
- Cosmetics (화장품)

나. Biolog의 Microplates는 박테리아와 yeast 동정뿐만 아니라 생물형(biotyping), 임상역학, 또는 오염의 근원추적 같은 미생물의 특성이 매우 자세히 요구되는 연구에 매우 유용하다.

다. 게다가 시스템은 예를 들어 생물학적 변화, 생물학적 치료, 또는 일반적인 환경 미생물학 등의 미생물의 대사능력을 이해하고 연구하기 위한 유례없는 방법을 제공한다.

## 6. Biolog용 배지종류 및 사용

미생물은 알맞은 배지에서 성장한다. agar 배지의 선택은 성장을 지원하는 영양원을 공급해야 하므로 매우 중요하다.

BUGM w/5% Sheep Blood - 대부분의 그램 양성균과 그램 음성균

BUGM w/1% Glucose - *Bacillus* spp.

BLA Agar - Lactic acid bacteria

BUY Agar - yeast

Tryptic Soy Agar - 대부분의 그램 음성균, *Clavibacter*속, *Curtobacterium*속

Blood Agar - 대부분의 그램 음성균

Chocolate Agar - fastidious 그램 음성균

## 7. 각균형별 동정시 주의사항

### (1) Gram negative 세균 동정시 주의사항

- *Burkholderia cepacia*와 *Flavobacterium*종은 약한 자주색의 거짓 양성기가 나타날 수 있다. 그러나 이색은 약하며 진정한 양성 반응들은 쉽게 구별할 수가 있다.

- *Klebsiella*, *Enterobacter*와 *Serratia* 균주들은 흔히 배양 4-6시간 후에 동정이 가능하다. 그러나 24시간 배양후에 어떤 균주들은 모든 well이 어두운 자주색의 거짓양성으로 나타나 양성이 읽을 수 없을 수도 있다. 이것은 아마도 세포의 분비하는 세포외 다당류에 의해 일어나거나 탄소원을 천천히 이용함으로써 생긴 것이다. 만일 균주가 4-6시간 배양후에 동정이 안된다면 보통 현탁액 수준에 비하여 20배로 희석한 현탁액을 만들어 분주를 다시 하라. 이 희석은 세포의 다당류가 더 이상 방해하지 않기 위한 것이다. 그래서 microplate를 24시간 배양하고 24시간 data base에서 결과를 해석하라.
- *Salmonella* 또는 *Shigella* 균주는 동정할 때는 혈청에 의한 검정을 부가적으로 하기 바란다.

## (2) Gram positive 및 Lactic acid 세균 동정시 주의사항

- Spore-forming 그램양성 간균은 영양이 충분한 곳에서 자라지 않을 경우 내생포자를 형성하는 경향이 있다. 이런 이유 때문에 spore를 형성하는 균주들은 꼭 BUGM+Glucose의 배지에서 배양해야만 한다. 더 나아가 배양기에서 세균을 취할 때 배지상에서 콜로니의 가장자리를 취한다. 이 세균들은 영양 원에 대한 경합이 적게 경험했으며 그러므로 포자형성이 적을 것이다. 포자가 형성된 균을 사용할 때 결과는 거짓양성으로서 읽을 수가 없을 것이다.
- *Lactobacillus* 균주는 두 가지의 별도과정이 필요한데 첫째, BLA배지에서 배양해야하고 두 번째는 Saline water 대신에 BLA Broth에 현탁액을 만들어야 한다. 그러나 *Lactococcus*는 BLA에 배양하고 Saline water에 현탁액을 만들어야 한다.
- *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*와 *Rhodococcus*종들은 가끔 거짓양성인 약한 자주색이 된다. 이색은 진정 양성 반응보다 덜 희미한데 Reader에서는 구별할 수 있다. 그러나 적당하지 못한 배지에서 자랐을 때는 이런 종에서 거짓양성인 진한 자주색도 나타나는데 완전히 양성과 구별할 수 없다.

## (3) Yeast 동정시 주의사항

- Yeast 동정시 Microplate의 배양은 24, 48, 72시간 배양해야 충분한 양상의 변화를 조사할 수 있으며, 배양온도는 26°C의 배양기에서 배양해야 한다.

## (4) *Escherichia coli* 및 *Salmonella*종 동정시 특성

- Microplate에서의 특이적인 검사는 각 균주들의 분해특성을 조사하기 위하여 종합적인 set를 만든 것이다.
- QC를 검사하기 위하여 isogenic이라 생각되는 균주들은 95개의 시험에 대해서 쉽게 비교할 수 있다.
- Epidemiology 연구를 위해 다른 균주들은 그들이 분해 대사가 얼마나 다른지를 알므로서 쉽게 실험할 수 있다.
- 변이균주 특성을 위해서는 알려진 분해대사 변이의 존재를 쉽게 증명할 수 있고 또한 포착하기 어렵거나 알려지지 않은 변이의 존재도 쉽게 검사할 수 있다. 단순변이 또는 자연(natural)이나 재조합된 plasmid의 존재도 대사와 탄소원 이용과정에서 이중적인 효과를 볼 수가 있다.