

## Waterborne Pathogens Identification in Public Bathroom by PCR-Reverse Blot Hybridization Assay

Seung-Gu Choi<sup>1</sup>, Woon-Heung Song<sup>2</sup>, Jae-Sang Lee<sup>3</sup>, Byoung-Seon Yang<sup>4</sup>  
and Myeong-Sik Choi<sup>5</sup>

Department of Clinical Laboratory Science, Shinheung College, Uijeongbu 480-701, Korea<sup>1,2</sup>,

Dongarm Medical Institute, Goyang 412-814, Korea<sup>3</sup>,

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea<sup>4</sup>,

Department of Laboratory Medicine, Gachon University Gil Hospital, Incheon 405-760, Korea<sup>5</sup>

A total of 30 water samples were collected from 30 different public baths in Seoul, Korea. Contamination of public bath water by waterborne pathogens can cause disease outbreaks and contribute to increase background rates of disease. Pathogens in water was filtered by nitrocellulose membrane with 0.45  $\mu$ m pore size. The membrane filters were analyzed by both cultivation and polymerase chain reaction (PCR) amplification of partial 16S rRNA gene. Various microorganisms including 4 *Escherichia coli/Shigella* spp., 1 *Salmonella* spp., 3 *Pseudomonas aeruginosa* and 2 *Mycobacterium* spp. were identified by reverse blot hybridization assay (REBA). PCR-REBA was able to identify many bacterial genera in one assay. Our results suggest that appropriate hygiene practice and continuous monitoring is needed for reducing health risk associated with public bath houses.

**Key Words** : Public bathroom, Waterborne pathogene, REBA

### 서론

우리나라는 경제적 발전과 더불어 여가 산업의 성장으로 건강과 여가를 즐기는 인식이 강해져 건강과 여가의 문화를 이용하는 목욕사업도 발달하고 있다. 대중이 많이 이용하는 공중이용 목욕탕 시설에서는 오염도에 따라 전염병 등의 질병 발생 가능성이 있어, 병원성세균의 존재 등 위생상태 파악에 대한 위험성을 알리는 연구들이 이루어지고 있다(Chung, 2002). 수인성 병원체(waterborne pathogens)는 오염된 물을 마시거나 오염된 물로 씻은 음식물의 섭취를 통하여 감염되어 장 관계 질병을 일으킬 가능성을 갖는 미생물을 말한다. 또한 감염의 매개체로서 물에 의하여 감염

되어 발생하는 전염병을 수인성 전염병으로 총칭한다. 특히 목욕시설에서는 적절한 온도와 습도가 유지되고 호흡기환자, 설사 환자 등 많은 사람들의 몸에 노출이 되어 병원체가 다수 포함되어 있을 가능성을 제시하였다(Jawetz 등, 2009). 기존 연구에 따르면 목욕시설 및 온천에서 검출된 병원체로는 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* spp., *Legionella pneumophila*, nontuberculous mycobacteria (NTM) 등이 있으며 대부분이 설사, 두통, 복통 등의 증상을 보이거나 자연적으로 치유되는 가벼운 증상을 나타내거나, 일부는 심각한 증상을 유발하며 특히 면역체가 약화된 사람에게는 치사까지 이르게 할 수 있다(Chiang 등, 2006). 특히 NTM 불리는 환경 미코박테리움(environmental mycobacteria, EM)은 mycobacteria의 대다수를 이루며 사람에게 중요한 병원성 세균으로 인식되어 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Falkinham, 1996; Livananinen 등, 1997). NTM은 토양, 음식, 에어로졸을 포함하는 모든 자연 생태계에 공통적인 부패균(saprophyte)이다(Kazda, 1983). NTM은 지표수, 지하수를 포함한 광범위한 수계에 분포하

Corresponding Author : Yang, Byoung Seon. Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea.  
Tel: 010-2835-7191. E-mail: ybseon@hanmail.net.

Received : 30 AUG 2011

Return to modification : 15 SEP 2011

Accepted : 23 SEP 2011

며, mycobacteria의 세포벽은 두꺼운 지방질로 구성되어 있고 소수성 표면을 갖고 있어서 여러 화학 소독제에 대하여 높은 저항성을 갖고 넓은 범위의 pH와 온도에서 견딜 수 있어 오랜 기간 동안 살아남을 수 있다(Le 등, 2001; Jawetz 등, 2009). 그러나 현재까지 관리 기준이 총대장균군 기준 외에 다른 유해미생물 기준 등이 설정되지 않아 보건관리에 위험성을 드러내고 있다(한국통계정보, 2009). PCR-reverse blot hybridization(REBA)방법은 의료와 공중위생분야에서 병원체검출에 많이 이용되는 분자생물학적 방법이다. 이 방법은 여러 가지 검체에 대한 다양한 탐색자를 사용하여 병원체를 검출하기 때문에 각각 병원체를 검출하는 일반 PCR 방법에 비해 단순하고 비용이 적게 드는 방법이다. 본 연구에서는 서울시에 위치한 대중목욕탕의 수질에서 유해 미생물을 검출하기 위해 분자생물학적 기법인 중합효소연쇄반응(PCR) 및 역교잡법(REBA)을 이용하여 다양한 종류의 병원체를 파악하고자 하였다

## 재료 및 방법

### 1. 시료 채수 및 미생물 배양

목욕시설 내에서 수인성 병원미생물의 유무 확인을 위해 수도관 내 목욕업소로 등록된 30곳에서 2009년 10월부터 11월까지 고시된 방법에 따라 각각 1L을 채수하였다. 시료 채수 후, 4℃에서 냉장 보관하여 수송하였고 30시간 이내에 실험을 시행하였다. 채수한 시료에서 병원성미생물을 배양하기 위해 고시된 선택배지들을 사용하였다. 또한 mycobacteria를 선택적으로 배양하기 위해 일반적으로 장기간의 배양기간이 필요한 mycobacteria가 다른 세균이나 곰팡이에 의해 성장 방해막기 위해 방법인 탈오염과정(decontamination)을 실시하고 Lowenstein-Jensen배지(Difco Lab., Detroit, MI, USA)에 접종하여 37℃에서 배양하였다. 단일 집락들을 확인하기 위해 6주 동안 매주 1회씩 관찰하여 확인하였다(Falkinham 등, 2001).

### 2. DNA 추출 및 PCR 실시

PCR을 수행하기 위해 REBA waterborne ID kit (M&D,

Wonju, Korea)를 사용하였다. DNA를 분리하기 위해 시료를 conical tube에 넣어 4,000x g에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 침전물을 1.5 mL conical tube에 넣고 9,000x g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 상층액 제거 후, kit의 술식에 따라 DNA를 분리하여 5  $\mu$ L PCR template로 사용하고 제조사의 PCR (GeneAmp PCR System 2700, Perkin Cetus, Norwalk, CT, USA)조건에 따라 시행하였다. PCR 증폭산물의 결과 확인은 2% TBE agarose gel로 전기영동하여 EtBr로 증폭산물을 염색하여 UV transilluminator에서 반응산물을 확인하였다.

### 3. 역교잡법(REBA) 실시

역교잡법을 위한 표적 DNA는 biotin을 표지한 primer를 사용하여 증폭하였다. PCR 증폭산물은 변성시키기 위하여 20  $\mu$ L denaturation solution (DS) 20  $\mu$ L 혼합하여 실온에서 5분간 방치하였다. 변성된 PCR 증폭산물과 hybridization solution (HS) 460  $\mu$ L 잘 섞은 후 oligonucleotide probe가 부착되어 있는 membrane (B&F Diagnostics, Irvine, CA)은 골고루 뿌려서 50℃에서 90분간 혼성화(hybridization) 한다. 혼성화 후 aspirator로 slot에 있는 PCR 증폭산물을 제거하고 미리 데어놓은 washing solution (WS)을 1 mL 분주하고 62℃에서 90 rpm의 조건으로 항온수조에서 10분간 2회 세척하였다. 세척 후 conjugate dilution solution (CDS) 1 mL을 1:2,000으로 희석한 alkaline phosphatase-labeled streptavidin (Boehringer Mannheim, Germany)을 처리하여 25℃에서 60분간 반응시키고 반응액을 완전히 제거한다. 각 slot에 TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) 1 mL씩 분주하고 dancer (M&D, Wonju, Korea)로 1분씩 1회 반복한다. 결합된 DNA에 표지된 biotin label를 검출하기 위해 NBT/BCIP 염색액을 사용하여 발색반응을 수행하여 결과를 판독하였다.

## 결 과

### 1. PCR을 이용한 수인성병원체검출

시료 속에 존재하는 다양한 세균을 모두 증폭할 수 있고

록 16S rRNA 유전자 부위 중 모든 세균의 동정에 사용될 수 있는 특정 부위를 대상으로 중합효소연쇄반응을 이용한 증폭 과정을 진행 하였다, 그 결과 30곳 중 10곳의 시료에서 예상되는 크기인 479 bp의 증폭산물을 얻을 수 있었다.

## 2. 역교잡법을 이용한 수인성병원체 동정

수인성 병원균을 검출하기 위해 PCR 증폭산물을 이용하여 역교잡법을 수행하였다. 16S rRNA primer로 증폭된 PCR 증폭산물이 모두 결합할 수 있는 양성대조에 결합된 것을 확인하여 역교잡법의 성공적인 유무를 확인할 수 있었다. 30 곳의 시료 중 10곳의 시료에서 *E. coli/Shigella* spp. 4균주, *Salmonella* spp. 1균주 *Pseudomonas aeruginosa* 3균주, *Mycobacterium* spp. 2균주의 병원성 미생물을 검출하였다. 나머지 곳들의 시료에서는 그람음성, 양성 대조에서 결합된 것으로 보아 미생물이 존재하는 것으로 보이나 병원성 미생물이 존재하지는 않는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

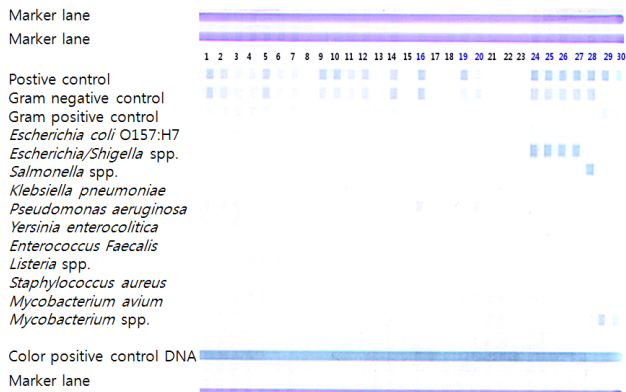


Fig. 1. Reverse blot hybridization using nested PCR products amplified from public bath house.

## 고 찰

사람들이 많이 이용하는 공중 목욕탕의 원수 및 욕조수는 통상적으로 수돗물이나 지하수를 사용하고 있다. 그러나 자연 상태의 오염에 의해 수질이 악화 될 가능성이 많아졌을 뿐 아니라 최근 들어 정수장내에서 병원체 및 바이러스가 검출되었다는 보고도 있어 수질관리 및 모니터링 시스템

의 필요성이 강조되고 있는 실정이다. 공중위생관리법 시행규칙에서 제시하는 대중목욕탕의 원수 및 욕조수의 수질기준은 색도, 탁도, pH, 과망간산칼륨(KMnO<sub>4</sub>) 소비량, 총대장균군 및 대장균 등이다. 이 중 욕조수의 대장균군 검사방법은 환경부에서 설정한 수질오염공정시험법의 대장균군 시험 기준 중 평판집락시험기준을 이용하고 있다. 대장균군에 대한 수질검사를 의무화하고 있으나, 에어로졸을 통해 대기나 실내 공기 중에 확산되는 NTM를 포함한 다른 병원성 미생물의 항목은 설정되어 있지 않으므로 각별한 모니터링이 필요한 실정이다. 또한 단순처리 방법이 아닌 복합적인 방어 대책의 수립이 요구되고 있으며 이러한 방어 대책으로 병원체의 존재 여부를 빠른 시간 내에 인지 해낼 수 있는 모니터링 시스템의 개발이 중요시 되고 있다(Chung, 2002).

본 연구에서는 각 세균의 특징적인 유전자 정보를 기초로 하는 다양한 분자 진단학적 동정법을 이용하여 수도권 내에 위치한 대중목욕탕 중 30% 이상에서 병원체가 존재한다는 것을 확인하였다. 동정된 균 중 녹농균(*P. aeruginosa*)은 사람에게는 오염된 물을 통하여 상체에 감염되거나 병원 등에서 환자의 호흡기, 눈에 감염하여 병원감염성 폐렴의 주원인이므로 수영장이나 병원 등에서 녹농균은 주요 감시대상이 되고 있다(Choi, 2002). 또한 *Mycobacterium* spp. 중 흔히 알려진 결핵균이 아닌 NTM이 확인되었다. NTM은 토양, 하천, 먼지 등 자연환경에 정상적으로 널리 분포하고 있어, 과거에는 NTM이 분리 시 대부분 비병원성균으로 간주되어 왔으나, 최근 들어 AIDS 환자를 비롯한 면역결핍환자에게 감염되어 결핵을 유발하는 원인균으로 밝혀짐에 따라 병원성 세균으로 관심이 높아졌다. 또한 수돗물 또는 기타 물 공급원에서 NTM의 오염은 면역결핍환자의 결핵감염 원인이 될 수 있다고 알려져 있으며 공중보건의 문제점으로 지적되고 있다(Livananinen 등, 1997). 그러나 이들 미생물들의 오염여부를 알기 위해서는 까다로운 실험과정과 비용 및 노력이 소요되므로 모니터링 하기 힘든 실정이다(Meaysa 등, 2004).

최근 이러한 문제점을 극복하기 위해 병원체들을 신속, 정확하게 진단할 수 있는 분자생물학적인 검출기법이 개발되었다. 그 중 중합효소 연쇄반응을 기초한 동정방법들 중 교잡분석을 기초로 한 방법들이 많이 사용되고 있다. 그 중

역교잡법(reverse blot hybridization assay, REBA)은 PCR 증폭 산물과 탐색자들과의 교잡반응을 응용한 기법으로 막(membrane)상에 특이 탐색자를 부착하고 증폭된 PCR 산물을 반응시키는 방법으로 여러 가지 종에 특이적인 탐색자를 이용하여 다양한 검체를 시험할 수 있는 방법이다(Zwart 등, 2003; Chiang 등, 2006). 본 연구결과 *E. coli/Shigella* spp.가 4균주, *Salmonella* spp. 1균주, *Pseudomonas aeruginosa* 3균주, *Mycobacterium* spp. 2균주로 나타나 수인성 병원체 신속한 검출에 간이검사법으로 사용가능하였다. 결론적으로 환경시료에서 수인성병원체의 신속한 검출을 위한 분자생물학적인 검출기법을 이용하고, 정확한 종 동정을 위해 확인시험이 필요하며 안전한 목욕조와 목욕원수의 공급과 사용할 권리를 위한 수질기준 항목의 추가 설정이 필요할 것으로 사료된다.

#### 참고문헌

- Chiang YC, Yang CY, Li C, Ho YC, Lin CK, Tsen HY. Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. *Int J Food Microbiol*. 2006, 107:131-13.
- Choi SI. Proposal of Basic Concept for Enhancement of Drinking Water Regulation. *J Korean Soc Water Wastewater*. 2002, 16:205-217.
- Chung HM. Microbial Control of Tapwater, Monitoring or Treatment? *J Korean Soc Water Qual*. 2002, 183:229-235.
- Falkinham JO. 3rd, Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 1996, 9:177-215.
- Falkinham III JO, Cheryl D, Mark W. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria on drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol*. 2001, 67:1225-1231.
- Jawetz W, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. *Medical Microbiology*, 18th ed., 1989, p215-217. Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut/San Mateo, California.
- Kazda JF. The principles of the ecology of mycobacteria. In: Ratledge C, Stanford J, editors. *The biology of mycobacteria*, Vol. II. London, United Kingdom. 1983, p323-341. Academic Press.
- Korean statistical information service. available from: <http://www.kosis.kr/>. accessed 9 June 2009.
- Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution system. *Appl Environ Microbiol*. 2002, 68:5318-5325.
- Livananinen E, Martikainen PJ, Katila ML. Comparison of some decontamination methods and growth media for isolation of mycobacteria from northern brook waters. *Appl Microbiol*. 1997, 82:121-127.
- Meaysa CL, Broersma K, Nordina R, Mazumdera A. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *J Environ Management*. 2004, 73:71-79.
- Zwart G, van Hannen EJ, Kamst-van Agterveld MP, Van der Gucht K, Lindstrom ES, Van Wichelen C, et al. Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol*. 2003, 61: 5875-5883.