

## 분자생물학적 방법인 PCR-REBA를 이용한 대중목욕탕 수질 중 수인성병원성미생물 검출

송운흥<sup>1</sup>, 최승구<sup>1</sup>, 양병선<sup>2\*</sup>, 이재상<sup>3</sup>

<sup>1</sup>신흥대학 임상병리과, <sup>2</sup>진주보건대학 임상병리과, <sup>3</sup>동암의학연구소

### Detection of Waterborne Pathogens in Public Bath Houses by PCR-Reverse Blot Hybridization Assay (PCR-REBA)

Woon-Heung Song<sup>1</sup>, Seung-Gu Choi<sup>1</sup>, Byoung-Seon Yang<sup>2\*</sup> and Jae-Sang Lee<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dept.of Clinical Laboratory Science, Shinheung College

<sup>2</sup>Dept.of Clinical Pathology, Jinju Health College

<sup>3</sup>Dongarm Medical Institute

**요 약** 수인성 병원성 미생물에 의한 대중목욕탕의 오염은 질병발생의 원인이 된다. 본 연구에서는 대중목욕탕내에 존재하는 수인성 병원성미생물들을 확인하고자 하였다. 서울지역내의 30 곳 대중목욕탕에서 욕조수 시료를 채수하여 진행하였다. 수인성 병원성미생물의 검출은 0.45  $\mu$ m의 여과막을 이용하여 전통적인 배양방법으로 분리 및 동정하였다. 분자생물학적 기법을 사용하기 위해 미생물학적인 배양을 하지 않고 핵산을 추출하여 16S rRNA유전자를 표적으로 polymerase chain reaction-reverse blot hybridization (PCR-REBA)을 실시하였다. 미생물학적 배양방법에서는 지표 세균인 *Escherichia coli*와 *Shigella* spp.가 검출되었으며, 분자생물학적 기법인 PCR-REBA를 수행한 결과 *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp. 등의 수인성 병원성미생물이 7곳에서 검출되었다. 본 연구결과를 토대로 대중목욕탕의 욕조수내에 수인성병원성미생물에 의한 감염을 줄이기 위해 적절한 위생관리와 *E. coli*를 포함한 유해미생물을 선정하여 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 사료된다.

**Abstract** Contamination of public bath water by waterborne pathogens can cause disease outbreaks and contribute to background rates of disease. The aim of this study is to determine the prevalence of waterborne pathogens in public baths. A total of 30 water samples were collected from 30 different public baths in Seoul, Korea. Pathogens in water samples were concentrated by 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membrane filter, analyzed by both cultivation and polymerase chain reaction-reverse blot hybridization (PCR-REBA) of partial 16S rRNA gene. Various microorganisms including *Escherichia coli* and *Shigella* spp. were identified by microbiological cultivation. *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. and *Mycobacterium* spp. were identified by PCR-REBA. Our results suggest that appropriate hygiene practice and continuous monitoring is needed for reducing health risk associated with public bath houses.

**Key Words** : Public bath house, Waterborne pathogens Polymerase Chain Reaction-Reverse Blot Hybridization (PCR-REBA)

### 1. 서 론

최근 우리나라는 여가 산업의 성장으로 건강과 여가를

즐기는 통합된 인식이 강해져 건강과 여가의 목적으로 이용하는 목욕업계도 함께 성장하고 있다[1]. 대중이 많이 이용하는 공중이용시설에서는 오염도에 따라 전염병

\*교신저자 : 양병선(ybseon@jhc.ac.kr)

접수일 11년 05월 24일 수정일 (1차 11년 07월 19일, 2차 11년 07월 25일, 3차 11년 08월 02일 게재확정일 11년 08월 11일)

등의 질병 발생 가능성이 있어, 병원성세균의 존재 등 위생 상태 파악에 대한 위험성을 알리는 연구들이 이루어지고 있다[2]. 수인성 병원성 미생물 (waterborne pathogens)은 엄밀한 개념으로 오염된 물을 마시거나 오염된 물로 씻은 음식물의 섭취를 통하여 감염되어 장관계 질병을 일으킬 가능성을 갖는 미생물을 말한다. 또한 감염의 매개체로서 물에 의하여 감염되어 발생하는 전염병을 수인성 전염병으로 총칭한다. 특히 목욕시설에서는 적절한 온도와 습도가 유지되고, 설사 환자 등 많은 사람들의 몸에 의해 노출이 되어 병원성 미생물이 다수 포함되어 있을 가능성이 존재한다[3]. 기존 연구에 따르면 목욕시설 및 온천에서 검출된 유해 미생물로는 대장균 (*Escherichia coli*), 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*), 이질균 (*Shigella* spp.), 레지오넬라균 (*Legionella pneumophila*), 비결핵성 마이코박테리아 (Non-tuberculous mycobacteria, NTM) 등이 있다. 이들 유해미생물들은 설사, 두통, 복통 등의 증상 또는 자연적으로 치유되는 가벼운 증상을 나타내거나, 일부는 심각한 증상을 유발하며 특히 면역체계가 약화된 사람에게는 치사까지 이르게 할 수 있다[4]. 특히 NTM이라 불리는 환경성 마이코박테리아 (Environmental mycobacteria, EM)는 마이코박테리아의 대다수를 이루며 최근 들어 사람에게 중요한 병원성 세균으로 인식되어, 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 비결핵성 마이코박테리아는 토양, 음식, 에어로졸을 포함하는 모든 자연 생태계에 공통적인 부생 생물 (saprophyte)이다[5-8]. NTM은 지표수, 지하수를 포함한 광범위한 수계에 분포하며, 마이코박테리아의 세포벽은 두꺼운 지방질로 구성되어 있고 소수성 표면을 가지고 있어서 여러 화학 소독제에 대하여 높은 저항성을 나타내고 넓은 범위의 pH와 온도에서 견딜 수 있어 오랜 기간 동안 살아남을 수 있다[7-9].

현재까지 유해미생물의 관리 기준은 총대장균군에 대한 기준이외의 것은 설정되지 않아 보건관리에 위험성을 드러내고 있다[10]. 공중목욕탕 내에는 총대장균군 이외의 유해미생물이 존재할 수 있으며, 유해 미생물에 오염된 물이 각종 질환을 유발할 가능성이 있다.

본 연구에서는 서울시에 위치한 대중목욕탕의 시료에서 분자생물학적 기법인 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR) 및 역교잡법 (PCR-reverse blot hybridization, PCR-REBA)을 이용하여 지표미생물을 포함한 다양한 종류의 유해미생물을 파악하고 목욕탕 이용자의 인체에 위해가능성을 파악하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 시료 채수 및 미생물 배양

본 연구는 2009년 10월 중순부터 11월 초순까지 서울시 강북구에 목욕업소로 등록된 목욕탕내의 수인성 병원성미생물의 유무 확인을 위해 고시된 방법에 따라 각각 1ℓ을 채수하였다[10]. 목욕탕의 종류는 소규모 목욕탕과 찜질방을 포함하여 총 30곳의 목욕탕에서 시료 채수 후, 4℃에서 냉장 보관하여 수송하였고 24시간 이내에 실험을 진행하였다.

### 2.2 욕조수의 유해미생물 확인

총 30곳의 목욕탕에서 채수한 시료는 배양 및 분자생물학적 기법에 사용하기 위해 0.45 μm pore size (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, U.S.A.)를 사용한 막여과법을 이용하여 미생물을 농축하였다. 농축된 여과지의 유해미생물을 배양하기 위해 고시된 선택배지들을 사용하였다. 또한 마이코박테리아는 일반적인 다른 세균이나 곰팡이에 의해 성장 방해를 막기 위하여 탈오염과정 (decontamination step)을 실시하고 선택배지인 L-J 배지 (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, U.S.A.)에 접종하여 37℃에서 배양하였다. 단일 집락들을 확인하기 위해 6주 동안 매주 1회씩 관찰하여 확인하였다[11].

### 2.3 DNA 추출 및 중합효소연쇄반응(PCR)

목욕탕 욕조수내에 수인성 병원성미생물들은 분자생물학적 기법인 PCR-REBA waterborne ID® kit (M&D, Wonju, Korea)를 사용하여 확인하였다. DNA의 추출을 위하여 미생물학적인 배양을 하지 않고 시료를 막여과법으로 농축하였다. 시료를 통과시킨 여과지를 15ml conical tube에 넣고 phosphate buffered saline (PBS) 2 ml을 첨가한 후 vortex를 사용하여 부유하고 4000 × g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 침전물을 1 ml PBS로 부유시키고 1.5 ml conical tube에 넣어 9000 × g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. kit의 제조사 술식에 따라 DNA를 분리하여 5μl를 PCR template로 사용하고 제조사의 PCR 조건에 따라 시행하였다 (GeneAmp PCR®System2700). PCR 증폭산물은 2% TBE agarose gel로 전기영동하여 EtBr (0.5 μg/ml)로 염색하여 UV transilluminator에서 반응산물을 확인하였다.

### 2.4 중합효소연쇄반응-역교잡법 (PCR-REBA)

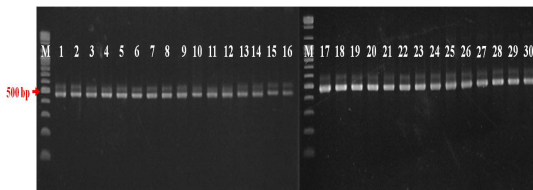
REBA를 위한 표적 DNA는 biotin을 표지한 primer를

사용하여 증폭하였다. PCR 증폭산물은 변성시키기 위하여 20  $\mu$ l와 denaturation solution (DS) 20  $\mu$ l을 혼합하여 실온에서 5분간 방치하였다. 변성된 PCR 증폭산물과 hybridization solution (HS) 460  $\mu$ l와 잘 섞은 후 oligonucleotide probe가 부착되어 있는 membrane에 골고루 뿌려서 50°C에서 90분간 혼성화 (hybridization) 한다. 혼성화 후 aspirator로 slot에 있는 PCR 증폭산물을 제거하고 미리 데어놓은 washing solution (WS)을 1ml씩 분주하고 62°C에서 90 rpm의 조건으로 항온수조에서 10분간 2회 세척하였다. 세척 후 conjugate dilution solution (CDS) 1 ml에 1 : 2000으로 희석한 alkaline phosphatase-labeled streptavidin (Boehringer, Mannheim, Germany)을 처리하여 25°C에서 60분간 반응시키고 반응액을 완전히 제거한다. 각 slot에 TBS (pH 7.5) 1ml씩 분주하고 dancer로 1분씩 1회 반복한다. 결합된 DNA에 표시된 biotin label를 검출하기 위해 NBT/BCIP staining solution 을 사용하여 발색반응을 수행하여 결과를 판독하였다.

### 3. 실험 결과

#### 3.1 종합효소연쇄반응 (PCR)을 이용한 수인성 병원성미생물 동정실험

시료 속에 존재하는 다양한 수인성 병원성미생물을 모두 증폭할 수 있도록 16S rRNA 유전자 부위 중 모든 세균의 동정에 사용될 수 있는 특정 부위를 대상으로 PCR amplification을 실시하였다. 그 결과 30곳 시료에서 모두 예상되는 PCR 증폭산물의 크기를 확인할 수 있었다.

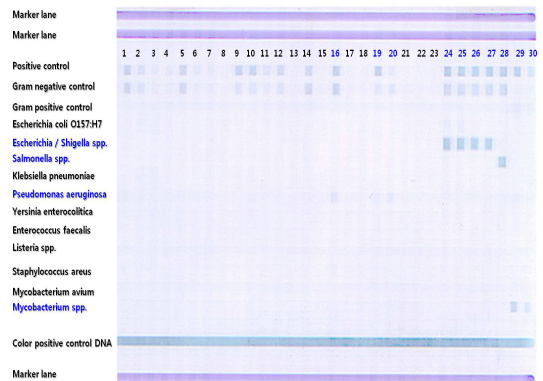


[그림 1] 목욕탕욕조수내 nested PCR을 이용한 16S rRNA 유전자 증폭. 생성물크기는 500bp. M, 100bp표준물질; Lane 1-30, 검체.

[Fig. 1] PCR amplification of 16S rRNA gene using nested PCR from public bath house. Product size is about 500 bp. M, 100 bp size marker; Lane 1-30, sample number.

#### 3.2 종합효소연쇄반응-역교잡법 (PCR-REBA)을 이용한 수인성병원성미생물 동정실험

수인성 병원균을 검출하기 위해 PCR 증폭산물을 이용하여 PCR-REBA를 수행하였다. 16S rRNA primer로 증폭된 PCR 증폭산물이 모두 결합할 수 있는 positive control에 결합된 것을 확인하여 REBA의 성공적인 유무를 확인하였다. 총 30 곳의 시료 중 10곳의 시료에서 *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Mycobacterium* spp. 의 수인성 미생물의 존재를 확인할 수 있었다. 나머지 곳들의 시료에서는 gram negative, positive control에서 결합된 것으로 보아 미생물의 존재는 확인되었으나 kit에 포함된 수인성 병원성 미생물이 존재하지는 않는 것으로 확인되었다.



[그림 2] 목욕탕욕조수내 nested PCR증폭산물에 대한 PCR-REBA.

[Fig. 2] PCR-REBA using nested PCR products amplified from public bath house.

[표 1] PCR-REBA에 의한 수인성 병원성미생물동정 [Table 1] Identification of waterborne pathogens isolates based on PCR-REBA

Species isolated	Number of waterborne pathogen (%)
<i>E. coli/Shigella</i> spp.	4 (13.3)
<i>Salmonella</i> spp.	1 (3.3)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 (10.0)
<i>Mycobacterium</i> spp.	2 (6.6)
<b>Total</b>	<b>10 (33.3) / 30</b>

### 4. 고 찰

목욕탕의 원수 및 욕조수는 통상적으로 수도물이나 지하수를 사용하고 있다. 그러나 자연 상태의 오염에 의해

수질이 악화될 가능성이 많아졌을 뿐 아니라 최근 들어 정수장내에서 병원성 미생물 및 바이러스가 검출되었다는 보고로 인해 수질관리 및 모니터링 시스템의 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 수질오염공정 시험법의 대장균군 시험방기준 중 평판 집락시험기준을 이용하고 있다. 대장균군에 대한 수질검사를 의무화하고 있으나, 에어로졸을 통해 대기나 실내 공기 중에 확산되는 비결핵성 마이코박테리아를 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 병원성 미생물의 존재 여부를 빠른 시간 내에 인지 해낼 수 있는 모니터링 시스템의 개발이 중요시 되고 있다.

본 연구에서는 각 세균의 특징적인 유전자 정보를 기초로 하는 분자 진단학적 동정법을 이용하여 수도권 내에 위치한 대중목욕탕 중 30% 이상에서 병원성 미생물이 존재한다는 것을 확인하였다. 동정된 세균들 중 *Pseudomonas aeruginosa*는 일명 녹농균이라 부르며 사람에게는 오염된 물을 통하여 상처에 감염되거나 병원 등에서 환자의 호흡기나 눈에 감염하여 병원감염성 폐렴의 주원인으로 알려져 있어 수영장이나 병원 등에서 녹농균은 주요 감시대상이 되고 있다[3]. 또한 *Mycobacterium* spp. 은 토양, 하천, 먼지 등 자연환경에 정상적으로 널리 분포하고 있으며 과거에는 대부분 비병원성균으로 간주되어 왔으나, 최근 들어 AIDS 환자를 비롯한 면역결핍환자에게 감염되어 결핵을 유발하는 원인균으로 밝혀짐에 따라 병원성 세균으로 관심이 높아졌다. 또한 수도물 또는 기타 물 공급원에서 NTM의 오염은 면역결핍환자의 결핵감염의 원인이 될 수 있다고 알려져 있으며 공중보건의 문제점으로 지적되고 있다[5,11]. 그러나 이들 미생물들의 오염여부를 파악하지 위해서는 까다로운 실험과정과 비용 및 노력이 소요되므로 모니터링 하기 힘든 실정이다[12].

최근 이러한 문제점을 극복하기 위해 병원성 미생물들을 신속, 정확하게 진단할 수 있는 분자생물학적인 검출 기법이 개발되었다. 그 중 PCR을 기반으로 시행하는 방법들 중 교잡법을 기초로 한 방법들이 많이 사용되고 있다. 그 중 PCR-REBA 방법은 PCR 증폭 산물과 probe를

과의 교잡반응을 응용한 기법으로 membrane상에 specific한 probe를 부착하고 증폭된 PCR 산물을 반응시키는 방법으로 여러 가지 종에 특이적인 probe를 이용하여 다양한 검체를 시험할 수 있는 방법이다. 이러한 장점을 이용하여 16S rRNA 유전자의 특정부위를 target으로 하는 PCR 증폭산물을 이용한 PCR-REBA법은 수인성 병원성 미생물 검출에 적용이 가능하다 [1,13-16].

목욕탕 욕조수내에 유해미생물 검출에 관한 기존의 연구들은 배양방법을 선행하여 개체수를 증가시킨 후 분자생물학적 기법을 사용하여 확인하였다[1,17]. 그러나 배양방법은 시간 및 인력 소요가 요구되며, 배양조건이 까다롭거나 장기간의 배양시간을 요구하는 마이코박테리아 같은 유해미생물들은 배양하기 어려움을 가지고 있다. 본 연구에서는 개체수를 증가시키지 않고 욕조수내에 존재하는 유해미생물들은 검출하기 위해 민감도와 특이도가 높은 상용화된 키트로 nested PCR 과 PCR-REBA를 사용하여 유해미생물인 *E. coli*, *Shigella* spp., *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp.를 확인하였다. 또한 키트내에 선정되어 있지 않은 그람 양성 및 음성세균들이 확인되었다.

본 연구에서는 유해미생물의 검출을 전통적인 배양방법에 의존하지 않고 막여과법으로 농축한 후 PCR-REBA waterborne ID® kit (M&D, Wonju, Korea)를 이용하여 마이코박테리아를 포함한 4종의 수인성 병원성 미생물들을 확인하였다. 마이코박테리아는 이전 연구에서도 목욕탕 욕조수내에 존재하는 것으로 알려져 이 연구결과를 뒷받침하는 것을 알 수 있었다[17].

결론적으로 환경시료에서 마이코박테리아를 빠르고 정확하게 검출하기 위해 분자생물학적인 검출기법을 이용하여 안전한 목욕조와 목욕원수의 공급과 사용할 권리를 위한 수질기준 항목의 추가설정이 필요할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 대중 목욕탕 물이 NTM에 의해 오염돼 있음을 증명한 것으로, 대중 목욕탕은 많은 사람이 이용하는 중요한 공공장소로서 보다 철저한 물 관리가 필요함을 시사한다. 그리고 목욕탕 물의 NTM 오염 원인을 정확하게 규명하기 위하여 목욕탕 물 공급원수의 추가적인 조사가 필요할 것으로 사료된다.

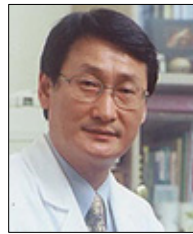
## Reference

- [1] Kim MS, Lee YM, Kim SK, S대 JH, Ji KH, Oh JY, Ko KD and Ko GP, "Investigation of Microbial Contamination of Public Bath in Jongno-gu, Seoul",

- Journal of Environmental Health Science*, 35: 162-168, 2009.
- [2] Korean statistical information service. available from: <http://www.kosis.kr/>. accessed June 9, 2009.
- [3] Jawetz W, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS and Ornston LN, *Medical Microbiology*, 18th ed., p215-217. Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut/San Mateo, California, 1989.
- [4] Chung HM, "Microbial Control of Tapwater, Monitoring or Treatment?" *J Korean Society on Water Quality*, 183: 229-235, 2002.
- [5] Falkinham JO. 3rd, "Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria", *Clin Microbiol Rev*, 9:177-215, 1996.
- [6] Kazda JF. "The principles of the ecology of mycobacteria. In: Ratledge C, Stanford J, editors. The biology of mycobacteria, Vol. II. London, United Kingdom, *Academic Press*, p. 323-341, 1983.
- [7] Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, and Vincent V, "Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution system", *Appl Environ Microbiol*, 68:5318-5325, 2002.
- [8] Lee ES, Yoon TH, Lee MY, and Han SH, "Inactivation of Mycobacteria by UV Disinfection", *J Korean Society on Water Quality*, 24, No. 2, 2007.
- [9] World Health Organization(WHO), *Pathogenic Mycobacteria in water*, IWA Publishing, London, UK, pp. 149-159. 2004.
- [10] The Ministry of Health and welfare, The enforcement of the Public Health Control Law (Article 4), 2009.
- [11] Falkinham III JO, Cheryl D. Norton and Mark W. Lechevallier, "Factors influencing numbers of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and other mycobacteria on drinking water distribution systems", *Appl Environ Microbiol*, 67:1225-1231, 2001.
- [12] Choi SI, "Proposal of Basic Concept for Enhancement of Drinking Water Regulation", *Journal of the Korean Society of Water and Wastewater*, 16: 205-217, 2002.
- [13] Chiang YC, Yang CY, Li C, Ho YC, Lin CK and 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*, 107:131-13, 2006.
- [14] Maynard C Berthiaume F, Lemarchand K, Harel J, Payment P, Bayardelle P, Masson L, Brousseau R, "Waterborne Pathogen Detection by Use of Oligonucleotide-Based Microarrays", *Appl Environ Microbiol*, 71: 8548-8557, 2005.
- [15] Meaysa CL Broersma K, Nordina R, Mazumdera A, "Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods", *Journal of Environmental Management*, 73: 71-79, 2004.
- [16] Zwart G, van Hannen EJ, Kamst-van Agterveld MP, Van der Gucht K, Lindstrom ES, Van Wichelen J, Lauridsen T, Crump BC, Han SK, Declerck S, "Rapid Screening for Freshwater Bacterial Groups by Using Reverse Line Blot Hybridization", *Appl. Environ. Microbiol*, 61: 5875-5883, 2003.
- [17] Choi SG, Song WH, Kang CH, Cho KB, Lee JS, Lee JH, Kim SI and Jee SI, "Identification of Nontuberculous Mycobacteria Existing in Public Bathroom Water by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism", *The Korean Journal of Clinical Laboratory Sciences*, 40:1-5, 2008.

송 운 흥(Woon-Heung Song)

[정회원]



- 1997년 7월 : 한국보건직업인 국가시험원 시험위원장
- 2005년 11월 : 삼성서울병원 암센터 총괄검사실장
- 2011년 8월 ~ 현재 : 신홍대학교 임상병리학과 교수

<관심분야>  
의생명

최 승 구(Seung-Gu Choi)

[정회원]



- 1988년 2월 : 단국대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 1993년 2월 : 단국대학교 대학원 생물학과 (이학박사)
- 2011년 8월 ~ 현재 : 신홍대학교 임상병리학과 교수

<관심분야>  
의생명

**양 병 선**(Byoung-Seon Yang)

[정회원]



- 1991년 2월 : 한남대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 1997년 8월 : 한남대학교 대학원 생물학과 (이학박사)
- 2011년 8월 ~ 현재 : 진주보건 학교 임상병리과 교수

<관심분야>  
의생명

---

**이 재 상**(Jae-Sang Lee)

[정회원]



- 2011년 8월 ~ 현재 : 동암의학 연구소 이사장

<관심분야>  
의생명