

환경수중 *Mycobacteria* 검출기법 조사

수질연구부 수질관리과
이은숙, 이목영, 이인근, 오세종

Detection method of *Mycobacteria* in Environmental Water

Water Quality Research Division

Eun-Sook Lee, Mok-Young Lee, In-Gun Lee, Sea-Jong Oh

Abstract - Nontuberculous mycobacteria (NTM) have been found in drinking water and pipe line of distribution system. Some species are opportunistic pathogen causing pulmonary, lymphadenitis for human. Because these organisms grow very slowly, it isn't easy to detect them in water. So, we studied the accurate and rapid method to detect NTM in environmental water samples. Samples were decontaminated by cetylpyridinium chloride (CPC) to reduce the growth of background organisms. The result indicated that pre-treatment of 10mL-surface water sample with 0.01% CPC and that of 1L-tap water sample with 0.001% CPC for 5 minutes at room temperature are suitable as effective decontamination concentration and time. After the decontamination procedure, the samples were inoculated on Middlebrook 7H10 agar containing 0.5g/L of cycloheximide and the following colony were staining Ziehl-Neelsen technique. Centrifuge to concentrate the samples resulted in the lower contamination than filtration. The gene for hsp65 was chosen for identification of NTM by PCR (Polymerase Chain Reaction). A 439-bp fragments generated by PCR amplification were digested by restriction enzymes to identify NTM species. We could reduce in the inhibition by background organisms and the loss of NTM by CPC concentration and contact time determined in regard to water quality. Also, we obtained the results more rapidly and simply by using PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) for identification of NTM.

Key words : Nontuberculous mycobacteria (NTM), cetylpyridinium chloride (CPC), Middlebrook 7H10 agar, Ziehl-Neelsen staining, PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)

서론

마이코박테리아라고 하면 흔히 결핵을 일으키는 병원균으로 잘 알려져 있지만 최근 들어 비결핵성 마이코박테리아 (nontuberculous mycobacteria, NTM)가 하나의 중요한 병원균으로 인식되고 있으며, 이에 대한 감염과 검출에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

소위 비전형적인 마이코박테리아 또는 환경적인 마이코박테리아라고 불리는 비결핵성 마이코박테리아 (NTM)는 물, 토양, 에어로졸을 포함하는 모든 자연 생태계에 공통적인 부생 생물 (saprophyte)이다. 특히 NTM 종들은 수원과 관련된 에어로졸뿐만 아니라 폐수, 지표수, 지하수에서 발견되며, 영양분이 결핍된 물에서도 증식할 수 있다. 또한 염소를 포함하는 많은 소독제에 대해서 상대적으로 저항성을 갖고 넓은 범위의 pH와 온도에서 견딜

수 있어 오랜 기간 동안 상수도계통에서 살아남을 수 있다(Dantec C. L. 2002). 마이코박테리아는 성장률에 따라 slow growers, rapid growers로 나눌 수 있으며 이 중 slow growers에 속하는 *M. kansasii*, *M. avium* complex(MAC), *M. marinum*, *M. xenopi*와 같은 종(species)들은 면역력이 저하된 사람 또는 동물에 폐렴과 피부질환, 임파선염, 파종성 감염을 일으키는 병원성을 갖고 있다(Dantec C. L. 2002). 특히 *Mycobacterium avium* complex(MAC)는 면역력이 저하된 사람들에게서 폐렴이나 다른 질병을 일으킬 수 있는 병원균으로 물 공급계통이 MAC의 병원감염과 연결되어 있다는 여러 역학적인 연구 등 상당한 발견 자료가 존재한다. USEPA(United States Environmental Protection Agency)는 MAC를 CCL(Contaminant Candidate List) 목록에 포함하여 보건과 처리 연구 우위성, 특히 염소에 대한 저항성, 파이프(관)에 집락을 형성하는 능력, 공중 보건상의 중요성 등에 대해 연구를 실시하고 있다.

먹는 물에서 *Mycobacteria*의 출현과 질병사이의 관계를 나타내 주는 사건으로 1968년 체코슬로바키아에서 광업과 중공업에 종사하는 작업자들과 이들과 가까이 있는 사람들에서 *M. Kansasii* 감염이 조사되었다. 이 세균은 탕관의 샤워기(shower outlets)에서 분리되었고, 후에 전체 지역의 상수도계통이 오염된 것으로 관찰되었다. 네델란드 Rotterdam에서는 임상표본에서 *M. Kansasii*의 잦은 분리로 인해 먹는 물 공급체계의 조사를 실시한 결과, 이 세균 또한 수도물에서 자주 분리되었으며, 미국 Massachusetts에서 *M. avium* complex의 분리 증가는 먹는 물에서 이들의 발생률과 관련이 있었다(ADWG, 1996).

우리나라에서 비결핵성 마이코박테리아는 결핵성 마이코박테리아의 진단을 혼란하게 하는 방해균으로서 인식하고 있을 뿐, 환경 상에서 이들의 확인과 분리 등에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않다. 하지만 먹는 물에서의 비결핵성 마이코박테리아에 대한 분포조사는 공중보건상 매우 중요하며 이에 앞서 분석방법의 정립은 더욱 시급하다고 할 수 있다. 병원성이 있는 것으로 알려진 마이코박테리아는 대부분 매우 느리게 성장(slow growers)하는 특성을 갖고 있어 오랜 기간의 배양이 요구되며 또한 검사를 하고자 하는 수원의 수질에 맞는 정화단계(decontamination step)가 필요하다. 이러한 특성으로 배양만으로는 검출에 어려움이 있고 검출 시 신속한 대응이 어려우므로, PCR(Polymerase Chain Reaction)과 같

은 분자생물학적인 기법을 함께 사용하는 분석방법을 정립하여 추후 연구에 적극 활용하고자 한다.

재료 및 방법

1. 표준균주

미국표준종균협회(American Type Culture Collection)에서 구입한 *M. avium*(ATCC 35717), *M. xenopi*(ATCC 19971), *M. kansasii*(ATCC 35749), *M. gordonae*(ATCC 35757), *M. fortuitum*(ATCC 23010)를 실험에 사용하였다.

2. 환경시료채취

다양한 물 환경 시료에 적용 가능한 전처리 방법 및 검출기법을 정립하기 위해, 물 환경 시료는 직접 채취하여 배양된 표준균주액을 접종한 후, 그 적용성을 평가하였다. 지표수 시료는 광암, 구의 취수원수를, 수도물은 구의수계의 실험실 수도물을 사용하였다.

3. 검사방법

전처리 및 배양

마이코박테리아를 검출하기 위해서는 적어도 7일 이상 배양을 해야 한다. 특히 병원성이 있는 것으로 알려진 *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* 등은 더 느리게 성장하기 때문에 이들을 검출하기 위해서는 1달 정도의 오랜 배양기간이 필요하다. 그러므로 다른 세균이나 곰팡이에 의한 마이코박테리아의 성장 방해를 막기 위한 정화단계(decontamination procedure)는 필수적이다. 시료 정화를 위해서 Neumann et al.(1997), Cover et al.(1999), Falkinham et al.(2001)의 논문에서와 같이 Cetylpyridinium chloride(Sigma C9002;이하 CPC)를 사용하였으며 농도는 수질에 따라 다르게 여러 단계의 농도로 실험하여 최적 농도를 정하였다. 시료에 접종한 균주는 수도물에서 자주 분리되는 *M. gordonae*(ATCC 35757)으로 하였다.

지표수 시료 10mL에 최종농도가 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01% 되도록 CPC 처리를 하고 수도물은 1L에 대해서 0.005%, 0.002%, 0.001% 농도

로 CPC 처리를 하였다. 실온에서 5분, 10분, 20분, 30분 동안 배양한 후, 여과막(공극크기 0.45 μ m, 직경 47mm, Gelman)으로 여과하거나 3000 \times g, 20분 원심분리 하여 얻어진 침전물을 cycloheximide 0.5g/L가 첨가된 Middlebrook 7H10 agar에 접종하는 두 가지 방법으로 실험하였다. 5% CO₂가 공급되는 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1달 동안 배양하고 대조군의 개수와 오염율을 고려하여 알맞은 전처리 농도를 선정하였다.

염색

마이코박테리아는 세포벽에 고지질을 갖고 있어 일반 염색 방법으로는 잘 염색이 되지 않는 항산성(acid-fast) 세균으로 이러한 성질은 마이코박테리아를 확인하는데 매우 중요하다. carbolfuchsin으로 마이코박테리아를 열 고정시키고 3% acid alcohol에 의한 탈색과정을 거친 후, methylene blue로 염색하는 Ziehl-Neelsen 염색법을 사용하였다.

Genomic DNA 준비

DNA는 InstaGene matrix(Bio-Rad) 200 μ L에 Middlebrook 7H10 agar에 성장한 집락을 부유시켜 열처리와 원심분리 후 얻어진 상등액으로 부터 준비되었다.

PCR(Polymerase Chain Reaction)

마이코박테리아의 확인을 위한 방법으로 16S rDNA, 65-kDa heat shock protein, rboB DNA, Internal Transcribed Spacer를 암호화하는 유전자의 PCR에 의한 평가가 사용되고 있으나 비결핵성 마이코박테리아 확인을 위해서는 16S rDNA, 65-kDa heat shock protein에 기초한 방법이 주로 사용되고 있다. 중 수준에서 비결핵성 마이코박테리아의 확인은 16S rDNA, 65-kDa heat shock protein의 유전자를 증폭하여 얻어진 생산물을 제한 효소(restriction enzyme)를 이용하여 종(species)마다 다른 특이적인 단편들을 통해서 이루어질 수 있다(PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP). 16S rDNA에 기초한 PCR-RFLP 분석은 3~5개의 제한 효소를 사용해야 하므로 2개의 제한 효소를 사용하여 분석하는 65-kDa heat shock protein 유전자에 대한 PCR-RFLP 방법이 더 많이 사용되고 있다.

본 연구에서는 primers Tb11(5'-ACCAACGATGGIGIGICCAT-3')와 Tb12(5'-CTGTGCGAACCCATACCCCT-3')를 이용하여 hsp65 gene의 439-bp 단편을 증폭하여 제한효소 BstE II

와 HaeIII로 분해하는, Telenti et al(1993)에 의해서 고안된 PCR-RFLP 분석방법을 사용하였다. PCR 혼합물은 PCR mix(Takara)를 이용하여 template DNA 2 μ L, primer 각각 1 μ L를 넣고 총 50 μ L가 되도록 혼합하였다.

PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C 1분, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분의 35cycles로 이루어졌으며(GeneAmp PCR system 9600) 증폭 산물은 2% agarose gel에서 전기 영동하였고 439-bp 단편을 관찰하였다. 제한효소 BstE II와 HaeIII 5U, 증폭 산물 10 μ L, 각 효소에 상응하는 buffer(Bioneer) 2.5 μ L, 물 11.5 μ L이 포함된 혼합물을 37 $^{\circ}$ C, 1시간 동안 배양 후, 2% agarose gel에서 분리하였다.

결과 및 고찰

1. 전처리 및 배양실험결과

CPC농도 결정은 오염율과 재현율을 고려하여 오염 정도가 결과 판독에 지장을 주지 않고 대조군에 접종된 마이코박테리아 개수에 가장 근접한 농도로 결정하였다. 지표수의 경우, 막여과법을 사용하여 배양을 한 경우는 CPC 최고 농도인 0.05%에서도 다른 오염군으로 인해 마이코박테리아의 정확한 성장을 관찰할 수 없었으며, 원심 분리하여 침전물을 배지에 도말한 경우에는 오염도가 현저히 낮았다. CPC 농도가 0.01% 일 때 대조군과 1~10%의 농도 차이를 보였고 오염율도 적었다.

수돗물은 CPC 0.005%로 처리했을 때에는 농도가 너무 과하여 마이코박테리아까지 제거되어 정확한 결과를 얻을 수 없었으며 0.001%농도가 적당하였다. Middlebrook 7H10 agar에 cycloheximide 0.5g/L를 포함(Cover et al. 1999)하여 실험하였을 때, 곰팡이에 의한 방해를 더 줄일 수 있었다.

2. 염색에 의한 확인시험

Ziehl-Neelsen 염색법을 사용하여 염색한 결과, 항산성(acid-fast) 세균은 적색을 나타내었으며 그렇지 않은 세균은 파란색을 보였다.

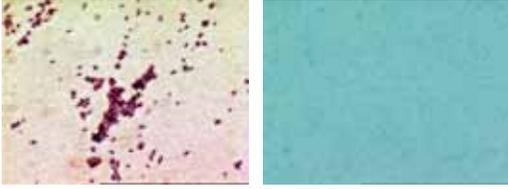


그림 1. 항산성 염색결과(Ziehl-Neelsen staining, 좌: *Mycobacteria avium*, 우: non-mycobacteria)

3. PCR에 의한 동정실험

속(genus) 판별

표준균주 *M. avium*(ATCC 35717), *M. kansasii*(ATCC 35749), *M. gordonae*(ATCC 35757), *M. fortuitum*(ATCC 23010)를 대상으로 primers Tb11(5'-ACCAACGATGGTGTGCCAT-3'), Tb12(5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT-3')를 이용하여 PCR을 실시한 결과, 그림 2와 같은 단편이 관찰되었으며 Telenti et al(1993)에서 제시된 439 bp와 일치하였다.

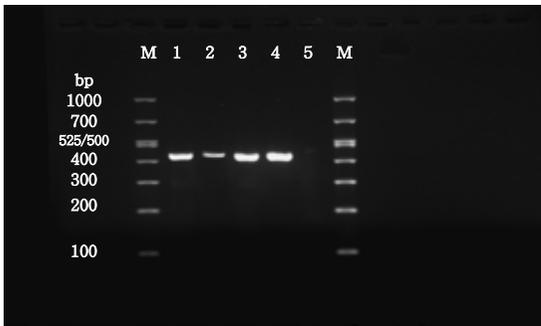


그림 2. 마이코박테리아의 속 특이적인 primers에 의한 PCR 결과 (M, molecular size marker; lane 1, *M. fortuitum*; lane 2, *M. kansasii*; lane 3, *M. avium*; lane 4, *M. gordonae*; lane 5, negative)

검출 민감도 측정

Tb11(5'-ACCAACGATGGTGTGCCAT-3')와 Tb12(5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT-3')를 primer로 이용한 PCR 분석의 검출 민감도를 측정하였다. 성장한 *M. gordonae* 집락을 10배율로 단계적으로 희석하여 DNA를 추출하고 각 희석 단계별 개수를 확인하기 위해서 Middlebrook 7H10 agar에 도말

하였다.

실험 결과 그림 3과 같이 10^{-6} 희석까지 PCR band를 검출할 수 있었고 10^{-6} 희석액을 도말한 평판에서 확인된 *M. gordonae* 개수는 120 CFU/mL 였다.

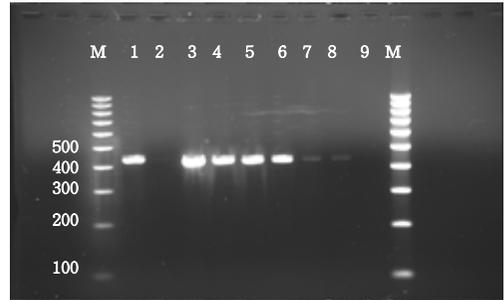


그림 3. 검출 민감도 측정 (M, molecular size marker; lane 1, *M. gordonae*(positive, 10^0); lane 2, negative; lane 3-9, 10배 희석($10^{-1} \sim 10^{-7}$))

PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)에 의한 종(species) 판별

마이코박테리아를 종 수준에서 구별하기 위해서 65-kDa heat shock protein 유전자에 대한 PCR을 실시한 후, *BstEII*와 *HaeIII*의 2가지 제한 효소를 이용하여 RFLP 특징을 파악하였다. 그림 4은 표준균주 *M. avium*(ATCC 35717), *M. kansasii*(ATCC 35749), *M. gordonae*(ATCC 35757), *M. fortuitum*(ATCC 23010)에 대해서 *BstEII*와 *HaeIII*에 의해 생성되는 단편들을 나타내었다.

*BstEII*에 의해서 *M. fortuitum*(ATCC 23010)은 235/115/81 bp, *M. kansasii*(ATCC 35749)는 237/208 bp, *M. avium*(ATCC 35717)은 237/206 bp, *M. gordonae*(ATCC 35757)는 230/115/80 bp의 단편을 나타내었다. *HaeIII*에 의해서 생성되는 단편의 크기는 *M. fortuitum*(ATCC 23010)은 149/124 bp, *M. kansasii*(ATCC 35749)은 133/105/70 bp, *M. avium*(ATCC 35717)은 136/111 bp, *M. gordonae*(ATCC 35757)는 231/123 bp 였다.

Telenti et al.(1993)에 의해서 제시된 RFLP patterns와 실험에서 얻어진 patterns을 표 1에 제시하였고 이들은 거의 일치하는 결과를 보였다.

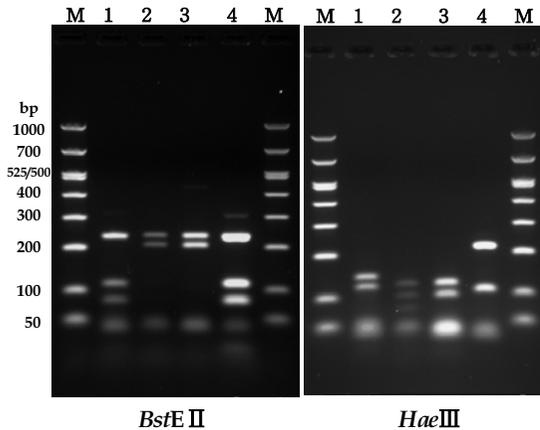


그림 4. 제한 효소 *BstE* II와 *Hae* III에 의한 RFLP patterns (M, molecular size marker; lane 1, *M. fortuitum*; lane 2, *M. kansasii*; lane 3, *M. avium*; lane 4, *M. goodnae*)

표 1. 마이코박테리아 표준균주의 RFLP patterns

Species(origin)	Molecular size (bp)		Molecular size described	
	obtained by this study		by Telenti et al.(1993)	
	<i>BstE</i> II	<i>Hae</i> III	<i>BstE</i> II	<i>Hae</i> III
<i>M. fortuitum</i> (ATCC 23010)	245/125/80	155/135	235/115/81	149/124
<i>M. kansasii</i> (ATCC 35749)	245/220	140/105/70	237/208	133/105/70
<i>M. avium</i> (ATCC 35717)	245/220	140/105	237/206	136/111
<i>M. goodnae</i> (ATCC 35757)	245/125/80	235/115	230/115/80	231/123

고 찰

마이코박테리아를 검출하기 위한 방법들이 많은 연구자들에 의해서 연구되고 있지만 비결핵성 마이코박테리아까지 검출하는 방법은 결핵성 마이코박테리아 검출 방법에 비해 상당히 제한적이다. PCR을 이용하여 비결핵성 마이코박테리아 확인을 위해서는 16S rDNA, 65-kDa heat shock protein에 기초한 방법이 주로 사용되고 있으며 종(species) 수준에서 마이코박테리아의 확인은 제한 효소(restriction enzyme)를 이용하여 종마다 다른 특이적인 단편들을 통해서 이루어질 수 있다(PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism,

PCR-RFLP). 이 연구에서는 3~5개의 제한 효소를 사용하는 16S rDNA에 기초한 PCR-RFLP 분석 보다는 2개의 제한 효소를 사용하여 좀 더 빠르고 간단하게 종 수준의 마이코박테리아를 분석하는 65-kDa heat shock protein 유전자에 대한 PCR-RFLP 방법을 사용하여 이 방법을 평가하고 환경수에서 마이코박테리아 검출에 적용여부를 결정하고자 하였다. 실험결과, 배양물에 대해서 1일이면 종 수준까지 확인할 수 있었고 실험 절차도 상당히 간단하였다. 하지만 Telenti et al(1993)에 의해서 제안된 RFLP algorithm에 포함되지 않은 제한효소 patterns를 갖는 새로운 종에 대해서는 앞으로 연구과정에서 추가 검토되어야 할 것으로 보인다. Telenti et al(1993)에 의해서 고안된 hsp65 PCR-RFLP 분석방법이 가장 많이 사용되고 민감도도 좋은 편이지만 PCR만으로는 신뢰성 있는 결과를 얻기는 어렵다. Chang et al.(2002)이 한 연구에서 직접적인 PCR을 했을 경우에는 마이코박테리아가 검출되지 않았지만 배양 후 PCR을 했을 때 마이코박테리아가 검출된 연구결과를 보았을 때, 임상 검체에 비해서 상당히 적은 농도로 존재하는 환경수에서 배양 방법은 아직까지는 필수적이라고 생각한다. 그러나 마이코박테리아의 특성상 배양을 할 경우 상당한 배양 시간을 요하기 때문에 신속한 결과를 산출하는데 어려움이 있다. 또 정화단계를 거칠 경우, 마이코박테리아는 박테리아나 곰팡이 보다는 이러한 처리에 더 저항성이 있지만 완전하게 저항적이지는 않기 때문에 많은 양의 마이코박테리아가 손실되어 신뢰성 있는 결과를 산출하기가 어렵다.

그러므로 앞으로 신속하고 민감성 있는 분자생물학적인 확인방법에 대한 연구가 요구되며 이러한 방법의 물 시료에 대한 직접적인 사용은 전체적인 마이코박테리아의 상을 잘 설명하고 검출 민감도를 증진할 수 있을 것이다.

결 론

1) 같은 CPC 농도에 대해서 막여과법을 사용하는 것 보다는 원심분리하여 침전물을 배지에 도달하는 방법이 오염도가 낮았다.

2) 지표수의 전처리 CPC 농도는 0.01%, 수돗물은 0.001%농도가 적당하였으며 CPC농도 결정은 오염율과 재현율을 고려하여 오염 정도가 결과 판

문헌 고찰

독에 지장을 주지 않고 대조군에 접종된 마이코박테리아 개수에 가장 근접한 농도로 결정하였다.

3) Middlebrook 7H10 agar에 cycloheximide 0.5g/L를 첨가하였을 때, 곰팡이에 의한 방해를 피할 수 있었다.

4) Ziehl-Neelsen 염색법을 사용하여 염색한 결과, 마이코박테리아는 적색을 나타내었으며 마이코박테리아가 아닌 세균은 파란색을 보였다.

5) 표준균주 *M. avium*(ATCC 35717), *M. kansasii*(ATCC 35749), *M. gordonae*(ATCC 35757), *M. fortuitum*(ATCC 23010)를 대상으로 primers Tb11(5'-ACCAACGATGGTGTGCCAT-3'), Tb12(5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3')를 이용하여 PCR을 실시한 결과, Telenti et al(1993)에서 제시한 439 bp부근에서 밴드가 관찰되었다.

6) Tb11와 Tb12를 primer로 이용한 PCR 분석의 검출 민감도를 측정한 결과, 10^{-6} 희석까지 PCR band를 검출할 수 있었고 이 때의 *M. gordonae* 개수는 120 CFU/mL 였다.

7) 마이코박테리아를 종 수준에서 구별하기 위해서 PCR을 실시하고 *Bst*EII와 *Hae*III의 2가지 제한효소를 이용하여 RFLP 특징을 파악한 결과, Telenti et al.(1993)에 의해서 제시된 RFLP patterns와 실험에서 얻어진 patterns은 일치하였다.

따라서, 환경수에서 마이코박테리아를 검출하고 분포를 조사하는 다음 연구에서는 지표수의 경우 CPC 0.01%, 수돗물은 0.001%로 전처리하고 원심 분리하여 얻어진 침전물을 배지에 도말하는 방법을 사용하여 cycloheximide 0.5g/L를 포함하는 Middlebrook 7H10 agar에 배양하여 마이코박테리아를 1차 분리할 것이다. 배양 후, Ziehl-Neelsen 염색에 의한 확인 시험과 PCR로 동정하고 RFLP 방법으로 종 수준까지 판별하는 분석방법을 적용하고자 한다.

1. Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. Botter, and T. Bodmer. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:175-178.
2. Covert, T. C., M. R. Rodgers, A. L. Reyes, and G. N. Stelma, Jr. 1999. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2492-2496.
3. Chiao-tang Chang, Ling-yu Wang, Chen-yi Liao, and Shiao-ping Huang. 2002. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3159-3161.
4. Steingrube, V. A., J. L. Gibson, B. A. Brown, Y. Zhang, R. W. Wilson, M. Rajabopalan, and R. J. Wallace, Jr. 1995. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 33:149-153.
5. Devallois Anne, Khye Seng Goh, and Nalin Rastogi. 1997. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 35:2969-2973.
6. Dantec C. L., Jean -Pierre Duguet, Antoine Montiel, Nadine Dumoutier, Sylvie Dubrou, and Veronique Vincent. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5318-5325.
7. Silva-Rocha, A., Costa Leite, C., Torres, H. M., Miranda, A. B., Pires Lopes, M. Q., Degrave, W. M., and Suffys, P. N. 1999. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. *J. Microbiol. Methods* 37:223-229.
8. Neumann M., Roland Schulze-Robbecke, Claudia H., and Katja B. 1997. Comparison of methods for isolation of mycobacteria

from water. 63:547-552.

9. Livanainen, E., Martikainen, P. J., Katila, M. L. 1997. Comparison of some decontamination methods and growth media for isolation of mycobacteria from northern brook waters. 82:121-127.
10. Izhar u. H. Khan and Jagjit S. Yadav. 2004. development of single-tube, cell lysis-based, genus-specific PCR method for rapid identification of mycobacteria: optimization of cell lysis, PCR primers and condition, and restriction pattern analysis. 42:453-457.

국문 요약

마이코박테리아는 먹는물과 배급수관망에서 자주 발견되는 폐렴, 임파선염 등 인간 감염과 관련이 있는 기회성 병원균이다. 느린 성장 특성으로 환경수중에서 검출하는데 어려움이 있어 이들을 가능한 정확하고 신속하게 검출하기 위한 방법을 정립하고자 하였다. 환경수중 마이코박테리아 검출을 위해 먼저 Cetylpyridinium chloride(CPC)를 사용하여 방해 오염균을 제거하였다. 지표수(10mL)는 0.01%; 5분, 수돗물(1L)은 0.005%; 5분이 가장 적합하였다. 전처리 후, Middlebrook 7H10 agar에 배양하여 항산성 염색을 하였다. 배양시 같은 CPC 농도에 대해서 막여과법을 사용하는 것 보다는 원심분리 후 농축물을 배지에 접종하는 방법이 오염도가 낮았다. 종(species) 수준까지 동정하기 위해서 hsp65 gene의 439-bp 단편을 증폭하여 제한효소 *Bst*II와 *Hae*III로 분해하는 PCR-RFLP(Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) 방법을 적용하였다. 수질에 따라 CPC 농도와 접촉시간을 정하여 마이코박테리아의 손실을 가능한 줄이고 방해 세균을 제거할 수 있었으며 배양 후 확인실험으로 PCR-RFLP를 적용하여 신속하고 간단하게 최종결과를 얻을 수 있었다.