

1. 생물학적 유해인자에 대한 개요

1.1 정의

생물학적유해인자는 살아 있는 유기체나 유기체들로부터 나오는 모든 것이다. 기관별로 정의는 약간 다르나 거의 비슷하다

- EPA

생물학적유해인자(Biological contaminants)는 살아있는 유기체로부터 나오는 것들이다(Biological pollutants are or were living organisms).

- 박테리아(bacteria)
- 곰팡이(mold)
- 바이러스(viruses)
- 애완동물 동물에서 나오는 가축, 털, 피부 등
- 고양이 침액(saliva)
- 집먼지
- 진드기(mites)
- 바퀴벌레(cockroach) 등
- 꽃가루

- ACGIH

Biologically derived airborne contaminants includes particles composed of or derived from living organisms) and VOCs released from living organism

- whole microorganisms(culturable, nonculturable and dead microorganisms)
- fragments
- toxins

- particulate waste products from all varieties of living things
(bacteria, fungi, plants, and animals)

1.2 유기체의 분류

1.2.1 진핵생물(eukaryote)

세포에 막으로 싸인 핵을 가진 생물이다. 원핵생물(原核生物)에 대응되는 말이다. 핵막으로 둘러싸인 핵을 가지며, 유사분열을 하는 세포로 형성된 생물로서, 단세포·다세포 동물, 남조류를 제외한 식물, 그리고 균류(fungi)가 이에 해당된다. 곰팡이, 동식물 등이 여기에 해당된다

- Mold(곰팡이 또는 사상균)

엄밀한 의미에서는 생물학상의 호칭은 아니고 원래는 유기질을 함유한 것의 표면에 돌아 나오는 미생물이나 그 군락을 말한다. 즉 주로 균류의 군사가 서로 섞여 엉클어진 것이다.

대부분의 곰팡이류는 현미경으로 보면 세포가 길쭉해져 있고 또한 세로로 연결되어 실과 같은 모양을 하고 있다. 이것을 균사라고 한다. 뚜렷한 세포핵을 가지고 있으며, 핵은 단핵·2핵·다핵인 것이 있는데, 특히 조균류의 것은 복잡한 모양의 전균체(全菌體)가 격벽 없는 다핵의 단세포체를 이루고 있다.

곰팡이는 포자(孢絲)를 형성하고 무성적으로 번식한다. 다른 것과 합체하는 일 없이 단독으로 발아하여 새 개체가 된다(그림 1참조). 포자가 실내로 들어와서 축축한 곳에 떨어지면 그곳에서 쉽게 자라고 번식한다. 주로 나무, 종이, 카펫, 음식 등에서 이렇게 쉽게 번식한다. 실내에서 지나친 습기 등이 제거되지 않고 남아 있을 때 곰팡이가 쉽게 자라게 된다. 실내에 번식된 모든 곰팡이나 곰팡이포자를 제거할 간단한 방법은 없다. 성장을 억제하는 유일한 방법은 습기를 관리하는 것이다.

곰팡이 포자는 보통 3-200 μm 사이이며 대부분 10-20 μm 이다. 공기중에 오래 떠 있기도 한다. 곰팡이에 대한 과민성알러지는 이 포자로 인한 것이 대부분이다. 실내오염에서 가장 중요한 곰팡이는 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Clasdosporium*이다.

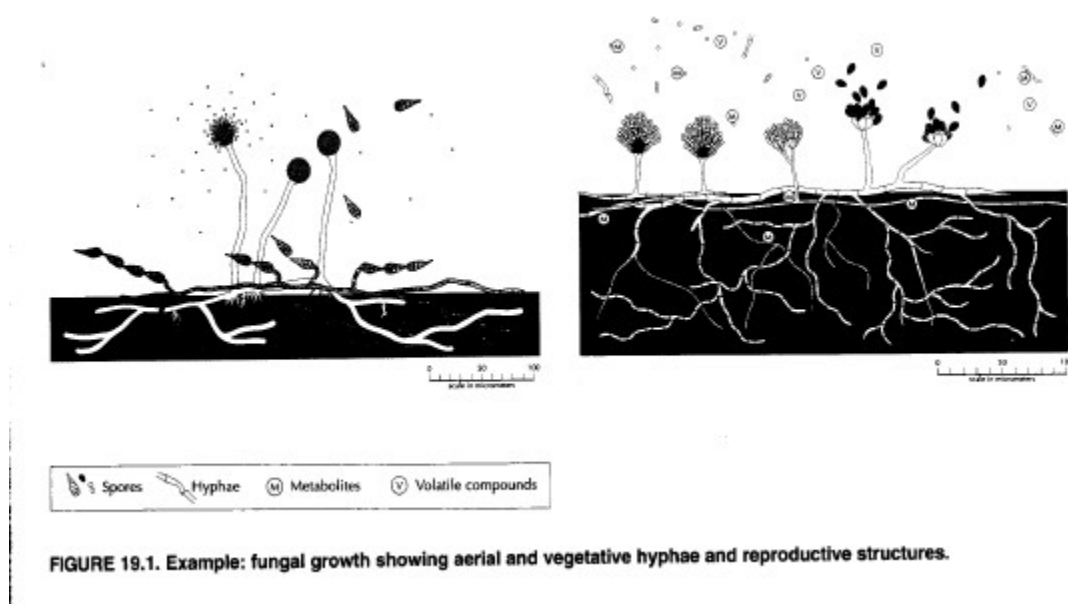


그림 1. 곰팡이 성장 : 균사(hyphae)와 번식구조

1.2.2 원핵생물(prokaryote)

원핵이라고 불리는 원시적인 세포핵을 가지는 생물로서 박테리아가 해당된다. 원핵생물은 모두 단세포로 되어 있으며, 원핵균류와 남조식물 등이 이에 해당된다. 원핵생물에서는 핵산(DNA)이 막으로 둘러싸이지 않고, 분자 상태로 세포질 내에 존재하며, 미토콘드리아 등의 구조체가 없는 것이 특징이다

- 박테리아(세균)

몸이 하나의 세포로 이루어진 가장 작고 하등한 미생물로서 박테리아라고도 한다. 크기는 일반적으로 1-5um 직경을 가지고 있다. 현재까지 2,000여 종이 알려져 있다. 엽록소가 없기 때문에 광합성을 할 수 없다. 따라서 땅속, 물속, 공기속, 사람의 몸속 등 어느 곳이나 양분이 있으면 기생한다. 세균이 자라기 위해서는 양분과 함께 알맞은 온도와 습도 및 산소가 필요하다. 20℃ 이하에서 잘 자라는 것을 저온성세균, 55~60℃에서 잘 자라는 것을 고온성세균이라고 하며, 그 중간 온도에서 자라는 것을 중온성세균이라고 한다. 그리고 산소를 필요로 하는 세균을 호기성세균, 산소 없이도 살 수 있는 세균을 혐기성세균이라 한다.

인체에 유해한 미생물 중에는 세균, 바이러스, 리케차 등이 있는데, 감염증의 대부분은 세균으로 인한 것으로 모든 장기가 감염될 수 있다. 원래 인체에 병원성 세균이 침입하면 기본적인 면역계에서 방어하지만, 효과적으로 병원성 세균을 제거하지 못할 경우에 인체에 질환이 나타난다. 감염된 장기에서는 열이 나고, 염증 반응이 생기며, 세균의 수가 증가한다. 세균 중에는 질환을 일으키지 않는 것도 있다. 예를 들면 대장·피부·구강·질 등에는 상재균이 있는데, 병을 일으키지 않을 뿐 아니라 인체 내에서 이로운 작용을 한다.

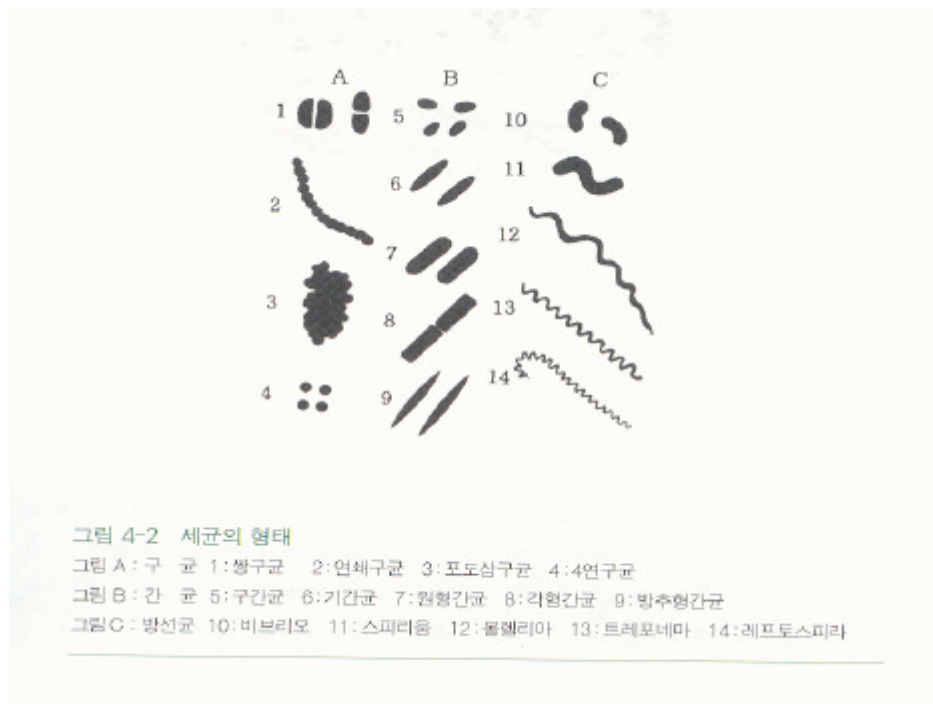


그림 2. 세균의 형태

표 1. 일반적인 Bioaerosol의 특성과 근원, 건강상의 영향 등의 요약

Source Organism	Airborne Unit	Disease Agent	Health Effects	Organism Lifestyle ^a	Indoor Sources
Viruses	Organisms	Influenza virus	Respiratory infection	Obligately parasitic	Human hosts
Bacteria	Organisms	<i>Legionella pneumophila</i>	Pneumonia, inhalation fever	Facultatively parasitic	Cooling towers
	Organisms	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Respiratory infection	Obligately parasitic	Human hosts
	Spores	<i>Thermoactinomyces</i> allergen	HP	Saprobic	Hot water systems; hot, damp surfaces
Fungi	Cell fragments, cell products	Endotoxin	Fever, chills	—	Stagnant water reservoirs
	Allergens	Allergens	Asthma	—	Industrial processes
	Organisms	<i>Sporobolomyces</i> allergens	HP	Saprobic	Damp environmental surfaces
	Spores	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Systemic infection	Facultatively parasitic	Bird droppings
	Allergens	<i>Alternaria</i> allergens	Asthma, rhinitis	Saprobic	Outdoor air, damp surfaces
	Aspergillus toxins: aflatoxin, ochratoxin, sterigmatocystin		Liver cancer	—	Damp surfaces supporting the growth of specific fungi
Protozoa	Cell fragments, cell products	Allergens, glucans, toxins, MVOCs	Headaches, mucous membrane irritation	—	Damp surfaces
	Organisms	<i>Mastiglena fowleri</i>	CNS infection	Facultatively parasitic	Contaminated water reservoirs
Algae	Cell fragments	<i>Acanthamoeba</i> allergens	HP	—	Contaminated water reservoirs
	Organisms, cell fragments	<i>Chlorococcus</i> allergens	Asthma, rhinitis	Autotrophic	Outdoor air
Vascular plants	Pollen	<i>Amoeba</i> (ragweed) allergens	Asthma, rhinitis	Autotrophic	Outdoor air
Arthropods	Fecal pellets, body parts	<i>Dermatophagoides</i> allergen	Asthma, rhinitis	Phagotrophic	Settled dust, house dust
Mammals	Dried skin scales, urine, saliva	Dogs, rodents, cats	Asthma, rhinitis	Phagotrophic	Animals, animal bedding
Birds	Dried excreta	Pigeon allergens	HP, asthma, rhinitis	Phagotrophic	Animals, nests, droppings

^a Autotrophic: synthesizes complex organic molecules from simple ones
Facultatively parasitic: can use a living host as well as non-living organic matter (see saprobic)
Phagotrophic: obtains energy-rich, carbon-containing compounds by eating plants or animals

Obligately parasitic: requires a living host
Saprobic: externally digests non-living organic material

2. 생물학적인자가 문제가 되기 위한 조건

2.1 미생물 성장과 노출조건

미생물 성장에 필수적인 2가지 요건은 영양분과 습기이다. 이러한 조건들은 모든 가정, 사무실, 사업장에서 갖추어져 있다. 즉 사람이 사는 곳에는 생물학 적유해인자가 존재한다고 보면 된다. 미생물이 건강에 장해를 초래할 수 있는 문제점으로 되기 위해서는 아래와 같은 4가지 조건이 존재해야 한다.

- 미생물이 성장하기 위한 적정한 장소(reservoir) : 냉각용 코일에서 흘러나오는 물을 저장하는 통
- 미생물의 성장에 필요한 영양분 : 냉각용 코일에서 흘러나오는 물을 저장하는 통에 들어있는 유기먼지
- 미생물의 증식
- 미생물을 포함한 물이나 매체의 공기중 분산(aerosolization 또는 dessemination) : 냉각용 코일에서 흘러나오는 물에서 성장한 미생물이 환기구를 통해서 공기중으로 분산

따라서 미생물로 인한 문제를 제거하기 위해서는 위에서 설명한 4가지 조건이나 환경을 억제해야 한다.

2.2 미생물로 오염되기 쉬운 장소들(HVAC를 중심으로)

실내환경에서 미생물로 오염되는 가장 빈번한 장소나 기구, 자료 등은 다음과 같다.

- 냉각코일, 가습기, 공기청소기
- 습기화된 냉각코일을 통과하는 공기
- 접근이 곤란한 공기조화장치 : 덕트 등
- 설계가 잘못된 공기조화장치

- 공기조화장치나 팬코일 환기장치내에 설치된 공극이(구멍이) 있는 방음용 섬유
- 통에 정채된 물(냉각코일 등)
- 지나친 습도(보통 70 %, 미생물억제를 위해 적정한 습도는 30-50 %)
- 인간활동으로 인해 생긴 박테리아나 바이러스의 축적과 재순환
- 사람의 기침, 재채기 등에 의한 박테리아와 바이러스의 전파
- 물로 오염된 각종 가구나 울(wool), 면(cotton) 등과 같은 유기섬유
- 냉각탑, 쓰레기 더미 등 외부의 미생물오염원 근처에 설치된 공기 유입구

2.3 HVAC 시스템 구성요소별 Bioaerosol의 발생 근원(그림 3 참조)

① Outdoor

- Outdoor air
- Building exterior

② HVAC system

- OAI(outdoor air intakes)
- Filters(A)
- Heat exchangers(B, C)
- Supply air plenums and ductwork(F)
- Supply air diffusers(G)

③ Occupied space

- Water-damage
- Chronic condensation
- Potted plants
- Carpet
- Fabric office partitioners, wall covering, drapes
- Portable humidifiers

- Return air plenums(I)

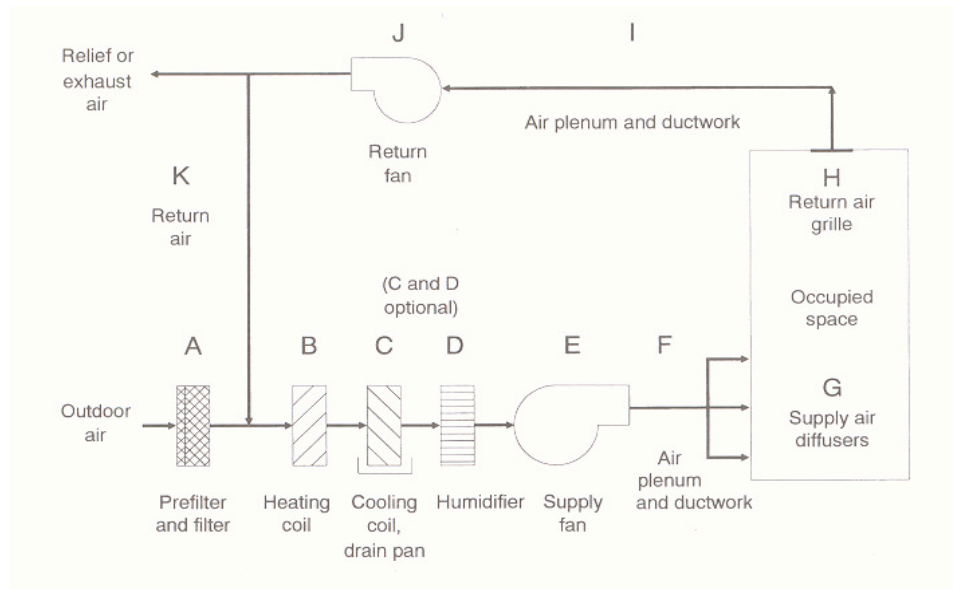


그림 3. 건물에서 전형적인 공조환기시설(Heating, Ventilating, Air-conditioning, HVAC)

3. 건강상의 영향

3.1 곰팡이

- Infectious diseases(감염성질환)
- Hypersensitivity diseases
 - Allergic reactions
 - Hypersensitivity Pneumonitis
- Toxic effects
 - Glucans : 대부분 곰팡이의 세포벽이다. 건강상의 영향은 엔도톡신과 같

은 자극성 영향을 가지고 있지만 엔도톡신보다는 영향이 적다. 먼지 중에 들어있는 Glucan에 노출되면 BRS와 연관성을 나타낸다

- Mycotoxins : Mycotoxins는 소화기계, 호흡기계, 피부접촉 등을 통해서 여러 가지의 건강상의 영향을 나타낸다. 건강상의 영향은 점막자극, 피부 발진, 어지러움, 졸림, 면역억제, 기형출산 그리고 암 등이다. Mycotoxin과 관련된 거의 모든 문헌은 소화기계흡수로 인한 장해를 언급하고 있다.

- Volatile Organic Compounds(VOC)

곰팡이는 자라면서 그리고 기질을 분해하면서 VOC를 생성한다. VOC 화합물의 일부는 특징적인 냄새를 내기도 한다. 이러한 냄새는 불쾌한 것이다. VOC노출이 BRS와 연관이 있다. 그러나 임상적인 질환에서 VOC의 역할은 아직 연구되지 않았다.

3.2 박테리아

- Infectious diseases(감염성질환)

박테리아는 감염성질환의 인자로서 가장 잘 알려져 있다. 박테리아감염은 음식물이나 물의 소화, 호흡분비물이나 대변의 직접적인 접촉, 이물체나 동물을 매개로 한 접촉 등 다양하게 이루어진다. 이 중에서도 호흡기를 통한 감염이 일반적이다. 감염성애어로슬은 사람(TB), 환경(*Legionella* spp.), 또는 다른 동물(탄저병 등)로부터 방출된다

- Hypersensitivity diseases

- Endotoxin과 관련
- 천식, 열병(hay fever) 등

- Toxic effects

- Exotoxin : 박테리아가 내부적(내제적)으로 생산하고 환경으로 방출하는 것이다. 그러나 공기 중에서는 아직 보고되지 않았다.

- Endotoxin : 부록 참조

- Volatile Organic Compounds(VOC)

곰팡이는 자라면서 그리고 기질을 분해하면서 VOC를 생성한다. VOC 화합물의 일부는 특징적인 냄새를 내기고 한다. 이러한 냄새는 불쾌한 것이다. VOC노출이 BRS와 연관이 있다. 그러나 VOC가 특정한 건강상의 영향과 초래하는 증거는 없다.

4. 박테리아와 곰팡이 채취, 분석방법, 자료해석에 대한 개요

4.1 박테리아

4.1.1 Sample collection

- 전략 : 사람들의 활동, 환기시설의 성능 등 고려
- Source sampling : 환경에서 박테리아의 집락은 좀처럼 눈에 보이지 않음. 그러나 슬림, biofilm, foam 등이 있었을 경우에는 박테리아의 존재를 나타내는 것임. 과일냄새 등 역겨운 냄새가 나는 경우 박테리아의 존재를 나타내는 것임.

예 : humidifier, cooling tower, drained drip, condensate pans 등 채취가 필요함

- Air sampling
 - ① Agar impactor
 - ② Multiple hole impactor
 - ③ Filters
 - ④ Impingers
- sample handling : 냉장보관 및 운반

4.1.2 Sample analysis

- Culture(배양) : 배지(media)를 통한 배양으로 박테리아 집락(colony)을 계수함. 살아 있는 박테리아만 계수하는 단점
- Fluorescence Microscopy : 필터에 채취된 박테리아를 염색한 후에 이들을 계수하므로 모든 박테리아를 다 계수

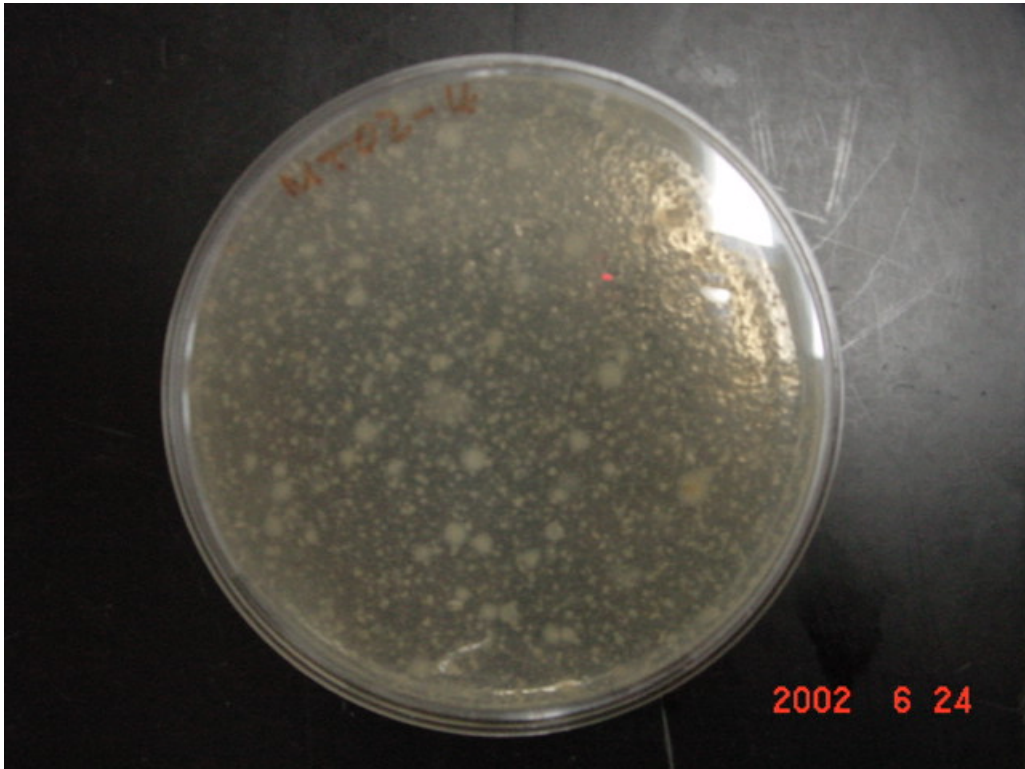


사진 1 : 박테리아의 집락

4.1.3 자료해석 : 6항 참조

박테리아 자료를 해석할 수 있는 지침이나 기준은 없다. 다음과 같은 질문을 하는 수 밖에 없다

- 건물에서 박테리아가 증식하고 있는가 ?

- 그렇다면 그 근원은 무엇인가 ?
- 사람의 활동으로 인한 박테리아가 문제점을 해결해야 할 정도의 높은 농도로 존재하는가 ?
- 존재하는 박테리아의 농도나 종이 건강에 위험을 줄 정도인가 ?
 - ① 외부에서 유입된 박테리아
 - ② 사람의 활동으로 생긴 박테리아(Human-source bacteria) : 부적정한 환경, 과도한 거주인원 등
 - ③ 그람음성박테리아
 - ④ 건강에 위험을 주는 중요하고 실질적인 박테리아
- 건강에 심각한 위험을 주는 것을 파악하는 것은 힘들다
- 질병발생과 관련되는 감염성박테리아의 농도에 대한 정보는 가능하다
- 감염성 : 결핵, *Legionella* spp.

4.2 곰팡이

4.2.1 Sample collection

- 전략 : 곰팡이 번식은 눈에 쉽게 인식. 곰팡이가 번식된 상태는 신속한 제거작업이 필요한 경우임. 추가의 벌크나 공기중 채취는 불필요함
- Source sampling :
 - ① Tape sampling with microscopic analysis : 균사나 포자 등의 확인
 - ② Culture of surface or bulk samples : 곰팡이의 종을 알기 위해
- Air sampling
 - ① Agar impactor
 - ② Multiple hole impactor
- sample handling : 냉장보관 및 운반

4.2.2 Sample analysis

- ① Culture(배양)
 - Malt Extract Agar(MEA)

- 농도가 높은 (10^5 CFU/m³) 산업인 농업, 금속가공유취급산업, 폐수처리장 등에서는 박테리아 성장을 억제할 수 있는 성분(chloraphenicol, penicillin, streptomycin 등)을 배지에 첨가하여야 함

② Microscopy

- 현미경으로 일반적인 곰팡이는 “속”과 “중”까지 알아낼 수 있음
- 자세한 동정을 위해서는 염색에 의한 동정

③ Chemical analysis

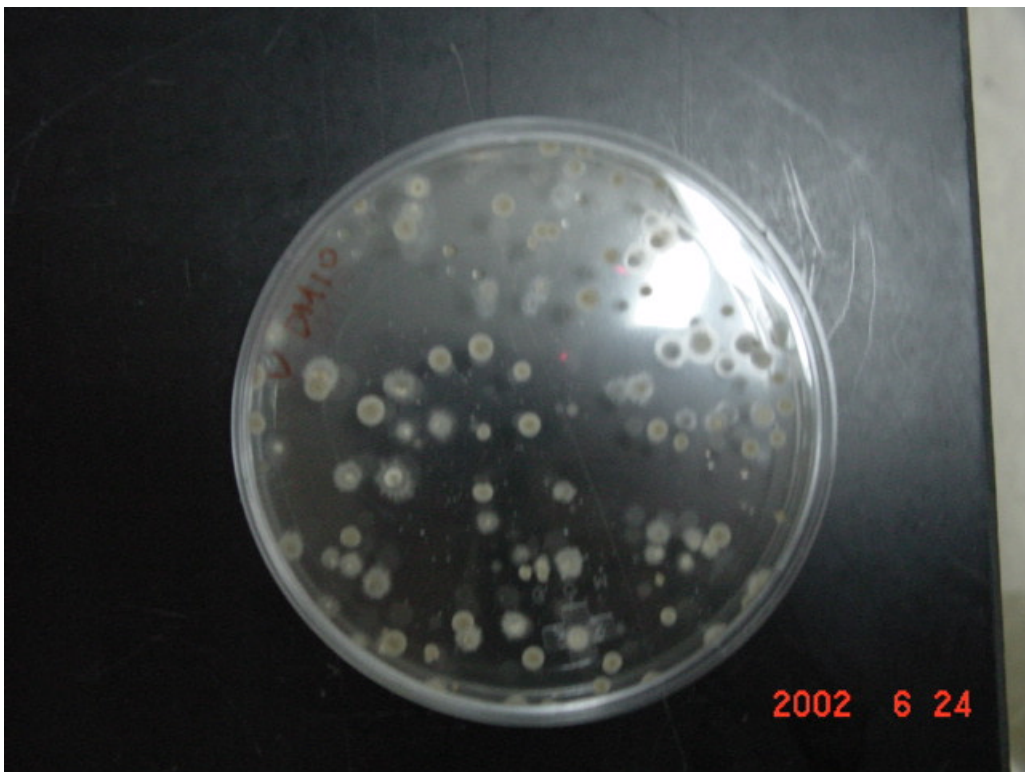


사진 2 : 곰팡이의 집락

4.2.3 평가

아직까지 곰팡이에 대한 측정결과를 비교하고 평가할 수 있는 지침이나 기준은 없다. 공기나 벌크에서 곰팡이자료에 대한 해석은 동정된 곰팡이 “속”이나 “종”에 근거하거나 서로 다른 환경에서의 측정자료를 비교하거나 여러 곰팡이인자에 노출된 그룹에서의 노출에 따른 잠재적인 감수성 등에 초점을 맞추어 설명한다

- 새나 박쥐의 분변에서 검출되는 병원성곰팡이 등

① AIHA의 지침

- 실외환경에서 검출되지 않았던 곰팡이종이 실내환경에서 많이 검출되었다면 이러한 곰팡이가 실내에서 자라고 있고 공기 질이 악화되고 있다는 것을 나타내는 것임
- 실내환경에서 어떤 병원성의 종(*Fumigatus*, *A. flavus* 등)이 발견되면 대단히 문제 : 신속한 위험관리프로그램 필요함

② International Society of Indoor Air Quality and Climate(ISIAQ)

- 필터에 의한 공조시설을 운영하고 별다른 문제가 없는 실내에서의 곰팡이 농도는 자연환기를 운영하는 실내에서의 농도보다 낮다
- 문제가 없는 건물의 실내환경에서 여러 종류의 다양한 곰팡이가 자라는데, 만일 습기문제가 계속되는 실내환경에서는 곰팡이 우점종이 1-2개로 나타난다.

③ ACGIH의 권고

- 실내환경에서 곰팡이의 번식이 눈에 보이는 상황은 노출이 일어나고 있다는 증거이다. 이러한 곰팡이 번식을 초래하는 조건은 적절한 방법에 의해 제거해야 한다

- 실내환경에서 곰팡이 냄새는 곰팡이 번식이 일어나고 있다는 증거이다. 벌크를 채취해서 번식이 일어나고 있는 근원지를 찾아서 확인해야 한다. 이러한 곰팡이 번식을 초래하는 조건은 적절한 방법에 의해 제거해야 한다.
- 실내환경에서 물이 (습기가) 계속해서 존재하면 곰팡이 번식을 초래할 수 있다. 이러한 조건은 개선되어야 한다
- 유기잔재물, 특별히 새나 동물의 분변물이 축적되면 곰팡이 오염 가능성이 매우 높아진다. 이러한 상황을 초래하는 조건은 적절한 방법에 의해 개선되고 제거해야 한다.
- 위에서 설명한 조건이나 상황에 대한 언급없이 공기나 벌크시료의 결과를 설명하려면 충분한 시료수가 있어야 한다. 이러한 조건이 갖추어지면 다음 내용에 따라 측정결과에 대한 해석을 할 수 있다

1) Indoor/outdoor relationships

일반적으로 문제가 없는 환경일 경우 실내에서의 곰팡이 농도는 실외와 비슷하거나 낮다(외부의 온도가 0이하인 겨울은 제외). 반대인 경우에는 실내에서 곰팡이 성장을 초래하는 조건이 있다고 볼 수 있다. 그러나 실내에서 곰팡이 농도가 낮은 경우에도 곰팡이가 성장할 수 있는 조건은 있을 수 있다.

2) Indicator Species

어떤 지표 곰팡이의 존재여부에 따라 “지나친 습기가 있다” 혹은 “건강상의 위험이 있다” 등을 나타낸다. 이러한 평가를 이용하려면 곰팡이 “종”을 동정하고 실내와 실외에서 어떤 종이 우점종인가를 규명하는 것이 가능해야 한다.

3) Potentially Pathogenic Fungi

병원성 곰팡이가 자랄 수 있는 물질이나 조건(새나 박쥐의 분변에서 *H. capsulatum* and *C. neoformans*)이 발견되었을 때는 병원성 곰팡이가 존재하고 가정해야 한다. 따라서 병원성 곰팡이가 자랄 수 있는 물질이나 조건은

제거해야 한다. 병원성 곰팡이를 함유하는 토양이나 다른 물질들을 취급할때도 세밀한 주의를 기울여야 한다.

5. 벌크와 공기중에서 Bioaerosol에 대한 채취 및 분석방법

5.1 벌크시료

미생물분석을 위한 벌크시료는 여러 가지가 있다. 카펫 조각, 바이알에 채취된 먼지, 환기용필터, 절삭유, 곡물, 사무실장비 등으로서 미생물이 번식되는 것으로 의심되는 고체나 액체의 시료를 말한다. 벌크시료의 채취과정은 다음과 같다.

- ① 적절한 채취용 서식과 서류를 준비
- ② 멸균용 비닐검사장갑을 착용하고 해당되는 벌크시료를 채취하여 포장한다.

이 때 채취하고자 하는 벌크의 위험정도에 따라 적절한 안전보호구를 착용하여야 한다

- ③ 포장된 시료를 적정하게 표기하고 포장백의 겉면을 깨끗이 소독한다. 즉, 포장된 백의 겉면을 0.5 - 0.6 % sodium hypochloride 용액으로 씻어 내린다. 이것은 겉면에 오염된 미생물이 다른 환경이나 실험자에게 오염될 가능성을 제거하는 조치이다. 보통 소독용 제제는 가정에서 사용하는 표백제를 물로 10배 희석하고 pH를 6-8로 맞추면 된다
- ④ 겉면까지 소독된 시료용 백은 사용하지 않았던 또 다른 백에 포장한다. 사용할 백은 Ziploc bag or Whirlpak이 좋다
- ⑤ 다음 사항을 기록한다
 - 시료번호와 채취자
 - 채취위치
 - 시료의 형태
 - 채취일과 시간
 - 채취지역에 대한 도면이나 지도

⑥ 시료를 실험실에 제출한다

시료를 운반하고 제출할 때는 적절한 지침과 규정에 따라 제출하여 야 한다. 관련되는 내용은 <http://www.bt.cdc.gov/LabIssues/PackagingInfo.pdf> 를 찾아보면 된다.

※ 미국은 시료의 위험정도에 따라 적절한 시설이 갖추어진 실험실(Bio Safety Level로 제출여야 한다

5.2. Swab을 이용한 표면채취 : 형겔봉을 이용한 채취

5.2.1 적용

형겔봉(면봉과 비슷하게 생겼음: 아래 그림 참조)으로 공극이 없는(구멍이 없는) 물체나 기구의 표면을 채취한다. 키보드, 접근하기 곤란한 지역, 우편물 분류함, 환기그릴 등의 규모가 작은 표면에서 이용된다.



사진 3. Swabs in vials with phosphate buffer(채취용 buffer와 같이 있기 때문에 따로 saline이나 PBS에 적실 필요가 없다

5.2.2 채취과정

① - ②는 벌크시료 채취와 동일하다

③ “멸균된 형겔(면이 아닌 것)”을 꺼낸다. 이것은 직접 만들어도 되고 제품으로 구매할 수도 있다. 만약 구매가 어려울 경우 형겔봉을 만들어 멸균된 물이나 saline 또는 멸균된 phosphate-buffered saline(PBS) 용액을 사용하여 적신다. 이러한 작업을 할 때는 미생물 오염이 되지 않게 무균상태에서 해야

한다.

④ 형겅봉으로 채취하고자 하는 표면을 닦아낸다. 이 방법으로 채취할 수 있는 권고되는 면적은 $100\text{ cm}^2(10 \times 10\text{cm})$ 이하이다. 이 보다 큰 면적을 채취할 경우에는 아래에서 설명할 Wipe채취나 진공채취 방법을 이용한다.

채취된 형겅봉은 건조되지 않도록 한다. 닦아낼 때의 방법은 전 채취면적을 대표하기 위하여 “S”자를 그리면서 해야 한다.

⑤ 채취된 형겅봉은 멸균용 튜브에 넣고 마개를 막고 벌크시료에서의 ③ - ⑤단계에서 동일하게 조치한다

5.3 Surface Wipe 채취 : Collecting Sterile Surface Wipe Samples(Qualitative or Quantitative)

5.3.1 적용

공극이 없는 물체나 기구의 표면을 멸균용 형겅으로 닦아서 채취하는 시료를 말한다. Swab(형겅봉)을 이용한 채취와 다른 점은 보다 큰 규모의 공극이 없는 표면에서 채취한다는 점이다. 책상표면, 카운터, 데스크, 파일케비넬, 공극이 없는 카펫 등에서 유용하게 이용된다

5.3.2 채취과정

채취하는 방법만 Swab채취와 다르다. 준비, 포장, 운반 등(①, ②, ⑤)은 Swab채취와 동일하다

- 방법

멸균된 3"x3"나 이 보다 적은 형겅패드(면이 아닌 것) (Handi-Wipe, sterile sponge)를 사용하여 채취한다. 형겅을 멸균된 물이나 saline 또는 멸균된 phosphate-buffered saline(PBS) 용액을 사용하여 적신다. 이러한 작업을 할 때는 미생물 오염이 되지 않게 무균상태에서 해야 한다. 형겅으로 채취하고자 하는 표면을 닦아낸다(Wipe). 이러한 방법으로 채취되는 표면적은 약 1 ft^2 (약 $30 \times 30\text{ cm}$)이다. Swab방법에 의한 채취면적보다 크다. 채취된 형겅은 건조되지 않도록 한다.

채취방법은 채취면적을 대상으로 수직으로 “S”자를 그리면서 한 후에 형겔 패드 접고 다시 수평으로 “S”자를 그리면서 채취한다.



사진 4. 멸균된 Handy-wipe sponge

5.4 HEPA Vacuum Cleaner채취 : Collecting Samples with a HEPA Vacuum Cleaner

5.4.1 적용

고성능필터로 진공상태에서 채취하는 경우는 구멍이 있는 것에 상관없이 채취해야 하는 면적의 규모가 큰 경우에 적합하다.

- 규모가 크고 공극이 있는 대상
- 카펫, 천장타일의 상층표면, 환기시설, 종이와 같은 먼지가 많고 공극이 없는 대상. 또한 채취된 먼지의 무게당 미생물집락수(CFU)를 정량적으로 구할 수 있는 방법이다.

5.4.2 채취과정

준비, 포장, 운반 등(①, ②, ⑤)은 Bulk, Swab채취와 동일하다

- 방법

펌프에 연결된 카셀트를 열린 채로 하고 채취하고자 하는 바닥이나 일정한 면적을 대상으로 채취함.

필터의 무게의 차이에 따라 Aerosol의 무게별 CFU가 계산됨

5.5 공기채취

5.5.1 적용 : Air Cassettes

구성은 공기중 화학적인자의 채취와 동일하게 펌프, 타이콘 튜브, 필터카세트이다. 사용해야 할 필터는 MCE필터, PTFE필터, 혹은 Gelatin필터(SK제품)를 사용할 수 있다. 규격은 37 mm, 공극은 0.8 μm 이다

5.5.2 채취

0.4 μm 의 pore size, 직경 37mm의 Nuclepore 여과지(Millipore Corp., Pleasanton California, U.S.A)와 지지대(support pad)를 멸균된 플라스틱 필터카세트(Millipore)에 장착하여 공기 중 박테리아와 곰팡이 채취용 여재로 사용한다. 이 여재를 근로자의 호흡기주변에 장착하고 채취유량 2 (ℓ /분)로 보정된 펌프로 근무시간동안 채취한다. 채취 후 여재를 포함한 카세트를 냉장상태에서 운반한 후 3일 이내에 분석한다.

5.6 시료에서 미생물 추출

0.01 % (V/V) Tween80(Aldrich 시약) 100 $\mu\ell$ 를 증류수 1 ℓ 에 혼합한다. 이 용액(0.01% Tween 80)으로 Peptone 0.1 % 농도를 만들어 추출액으로 사용한다. 즉, Peptone 1 g을 1 ℓ 에 녹인 다음 0.22 μm Millex-GS filter(Millipore Corp.)로 여과한 후 멸균하였다. 121 $^{\circ}\text{C}$, 15파운드 압력에서 15분간 멸균하여야 한다.

공기 중에서 채취한 필터카세트에서 미생물 추출과정은 아래와 같다. 추출액 1.5 ml를 카세트의 뒷구멍(outlet)을 통해 지지대에 주입한 후 플러그를 막고 다시 5 ml를 카세트의 앞구멍(inlet)으로 주입한 후 플러그를 막고 추출액이 누출되지 않도록 조치한 카세트를 교반대에서 15분간 흔들어 박테리아와 곰팡이가 용액에 추출되도록 한다

5.7 배지 제조

5.7.1 Plate Count Agar(박테리아)

Plate Count Agar(DIFCO 247940) 23.5 g을 증류수 1리터에 넣고 핫플레이트에서 교반하면서 완전히 녹인 후 박테리아용 배지로 이용한다.

5.7.2 Malt Extract Agar(곰팡이)

Malt Extract Agar(DIFCO) 33.6 g을 증류수 1리터에 넣고 핫플레이트에서 교반하면서 완전히 녹인 후 곰팡이용 배지로 이용한다. 모든 배지는 121 °C, 15파운드 압력에서 15분간 멸균하여야 한다.

5.8 희석액

미생물(박테리아와 곰팡이)의 수가 너무 많을 경우 계수하기가 힘들다. 이런 경우 희석액으로 희석하여 배양한 후 계수하였다. 희석액을 만드는 과정은 다음과 같다.

- 인산염완충원액(Stock Phosphate Buffer Solution)

KH_2PO_4 (Potassium Dihydrogen Phosphate) 34 g을 증류수 500 ml에 혼합하고 NaOH 1N로 pH를 7.2 정도로 조정하여 최종용량을 1 ℓ로 한다. 이 용액을 121°C, 15파운드 압력에서 15분간 멸균하여 냉장고에 보관한다

- 희석액

인산염 완충원액 1.25 ml과 MgCl_2 용액(38 g/리터) 5 ml를 넣고 증류수로 최종용량을 1리터로 제조하고 최종 pH가 7.2 ± 0.1 로 조정 희석액으로 사용한다.

5.9 박테리아와 곰팡이 배양 및 계수

카셀트에 들어 있는 추출액의 일정 양을 멸균된 마이크로피펫으로 배지에 옮긴다. 배지와 추출액(시료)을 혼합할 때는 “8”자를 쓰면서 배지가 페트리디쉬(petridish)의 천장에 닿지 않도록 조심스럽게 혼합하고 배지가 굳으면 배양기에 넣는다. 박테리아용 배지는 35 °C에서 2일간 그리고 곰팡이용 배지는 4일간 배양한 후 계수기로 계수한다. 계수하기 어려울 정도로 미생물 집락(Colony)이 많으면 희석하여 다시 집중하여야 한다.

박테리아와 곰팡이가 자란 페트리디쉬를 직접계수하고, 너무 많을 시에는 균등하게 4분할하여 1면에 자란 박테리아와 곰팡이의 집락을 계수하고 분할한 면을 곱하여 총 집락수로 한다. 집락수의 단위는 시료 1 ml당 colony forming units(CFU)이다. 여기에 추출액을 고려하여 여과지에 채취된 총 미생물수(CFU)를 채취된 공기용량으로 나누어 공기중 미생물 농도(CFU/m³)로 한다.

6. 평가

6.1 OSHA

OSHA는 정제된 물 1 ml에서 곰팡이가 10³이었을 때 그리고 먼지나 유기물체에서 g당 10⁶이었을 때를 오염된 기준으로 설정하였다.

Morey는 실외에서 곰팡이 농도는 환기가 적정하게 작동되고 있는 실내에서의 농도보다 4 - 배 높다. 즉 특별한 오염요인이 없고 적정하게 환기가 이루어지는 경우 실내에서의 미생물농도는 실외보다 낮다. 만약 실내에서 박테리아나 곰팡이의 농도가 실외보다 높을 경우 미생물 번식과 분산의 요인이 있는 것으로 볼 수 있다.

6.2 ACGIH(ACGIH TLV책자에서 발췌한 내용)

6.2.1 Total Culturable or countable bioaerosols(배양이나 계수가 가능한 총

박테리아나 곰팡이)

배양가능성 Bioaerosol은 실험실에서 일정한 배지와 배양조건에서 성장할 수 있는 박테리아와 곰팡이들을 말한다. 이 실험에서 배양된 미생물은 집락수(colony-forming units(CFU)로 나타낸다. 또 계수가 가능한 Bioaerosol은 현미경으로 꽃가루, 곰팡이 포자, 박테리아 세포 등을 인식하여 그 수들을 세는 것이다. 배양이나 계수가 가능한 총 박테리아나 곰팡이 수들에 대한 노출기준이 없다. 그 이유는 아래와 같은 과학적으로 입증되지 못하는 이유들 때문이다.

- 배양이나 계수가 가능한 총 박테리아나 곰팡이는 단일 개체가 아니다. 작업장에서 노출되는 Bioaerosol은 일반적으로 많은 서로 다른 미생물, 동물, 식물 입자로 혼합된 것들이기 때문이다. 이 중에서 배양가능하고 계수가 가능한 것들로만 노출기준을 설정하는 것이 문제가 있다

- Bioaerosol에 대한 사람의 반응은 노출조건이나 개인의 감수성에 따라 무제한 경우에서부터 매우 심각하거나 치명적이고 또는 질병이 걸리는 상황까지 다양하다. 그러므로 어떤 한 Bioaerosol에 대한 적절한 노출기준도 다른 인자에는 완전히 적정하지 않을 수도 있다

- 어떤 단일 방법을 사용해서 모든 Bioaerosol을 채취하고 평가하는 것은 불가능하다. Bioaerosol 물질을 채취하고 분석하는 믿을 만한 분석방법은 많이 있지만 서로 다른 경우가 대부분이다. 따라서 서로 다른 채취와 분석방법은 배양이나 계수가 가능한 총 박테리아나 곰팡이에 대한 서로 다른 추정치가 나오게 되어 서로 비교가 어렵다.

- 현재 배양이나 계수가 가능한 총 박테리아나 곰팡이의 결과치를 건강상의 영향에 대한 정보로는 양-반응관계를 설명하는데 부족한 것으로 알려져 있다.

6.2.2 배양이나 계수가 가능한 특정 Bioaerosols

배양이나 계수가 가능한 특정 Bioaerosols에 대한 노출기준도 없다. 현재, 배양이나 계수가 가능한 Bioaerosols과 건강상의 영향과의 관계에 대한 정보는 사례연구나 정성적인 노출평가자료들뿐이다. 즉 양과 반응관계를 정량적으로 설명하기 위한 필요한 정보는 충분하지 않다. 양-반응관계에 대한 역학적인 근거자료가 충분하지 못한 이유는 다음과 같다

- 특정 Bioaerosols에 대한 측정자료는 지표가 되는 인자 측정(indicator measurement)이며 실제 영향을 나타내는 인자에 대한 측정(actual effector agents)이 아니기 때문이다. 예를 들면 공기 중 곰팡이 항원에 대한 노출을 나타내기 위한 것으로 공기 중 배양 가능한 곰팡이(지표측정)를 측정을 이용하는 경우이다. 또 대부분의 측정이 실제 호흡기노출을 추정하는 개인시료 채취가 아니고 지역이나 벌크시료에 의한 측정결과이다.

- Bioaerosol의 구성성분이나 농도는 노출되는 환경에 따라 크게 다르다. 그리고 반복적으로 측정된 정보도 많지 않다. 더구나 일반적으로 사용하는 공기 채취기구는 짧은 시간 동안 측정한 순간채취(grab sample) 기구들이다. 이렇게 측정된 결과들은 오랜 시간 동안 측정한 결과보다 일정하게 높거나 낮아 노출 정도를 정확하게 추정하지 못한다. 따라서 어떤 유기체나 오염원은 순간적으로(혹은 우발적으로, episodic) 오염농도성분(concentration bursts)을 방출하는데 이들은 중요한 건강상의 영향을 초래할 수 있다. 따라서 짧은 시간동안 측정하는 제한된 순간채취로는 이들을 적절하게 검출할 수가 없다.

- 어떤 환경에서 근로자노출평가를 할 때, 생물학적인자의 오염이 제한적으로 일어났다면 노출로 인한 영향을 받은 사람은 많지 않을 수 있다. 즉 어떤 건물이나 환경에서 일하고 있는 소수만이 영향을 받을 수 있다. 따라서 서로 다른 연구로부터 나온 자료나 정보는 좀처럼 조사대상에 대한 유의한 숫자에 도달하지 못한다. 이것은 Bioaerosol과 관련된 질병을 일으키는 특정 생물학적 인자의 형태가 다양하고 연구들마다 서로 다른 결과를 보이기 때문이다. 이러한 요인들로 인해서 특정 생물학적인자의 노출과 질병(혹은 불만, 건강호소 등)간의 양-반응관계를 유의하게 설명할 수 있는 통계적인 강도가 약해지게 된다.

6.2.3 감염성 생물학적인자(Infectious agents)

일부 몇 개의 감염성 Bioaerosol에서 양-반응관계는 유의하지만 현재 공기 중 감염성 Bioaerosol에 대한 측정방법은 제한되어 있다. 공기 중 감염성질환의 전염 위험이 높은 시설들은 공학적인 대책을 철저히 하여 공기 중 감염성 인자의 농도를 최소화하여야 한다. 또한 이러한 시설들은 감염성 Bioaerosol에

대한 근로자노출을 예방하기 위한 행정적 대책과 보호구대책을 강구하여야 한다.

6.2.4 분석 가능한 생물학적인 인자들(Assayable biological contaminants)

분석 가능하고 생물체(미생물, 동식물)에서 발생된 생물학적인 인자들은 엔도톡신, 마이코톡신, 항원, 미생물이 내놓은 휘발성유기물(microbial VOC) 등을 말한다. 이러한 물질들은 화학, 면역학적, 또는 생물학적분석방법에 의해서 분석될 수 있다. 이러한 인자들에 대한 노출기준은 설정되어 있지 않다. 그러나 이중에서 엔도톡신이나 일부 항원들에 대한 분석방법은 점차적으로 개선되고 있고 정확도를 달성하기 위한 노력이 계속되고 있다. 한편 이러한 인자들에 대한 양-반응관계는 실험실연구나 가끔 역학조사에서 관찰되고 있다. 그러므로 노출기준의 설정도 미래에 가능할 것이다

부록 : 엔도독신에 대한 건강상의 장해인식, 측정, 분석

1. 정의

엔도독신은 그람음성박테리아의 외벽구성성분의 하나로서 독소(toxin)특성을 갖고 있다는 의미이다. 용어에서도 알 수 있듯이 독소(toxin)는 본래부터 존재하는(endo - intrinsic) 그람음성박테리아의 부분이기 때문에 endotoxin이라고 한다. 그람음성박테리아의 외벽을 정제하여 보면 엔도독신은 Lipopolysaccharides(LPS)라고 하는 분자계로 구성되어 있다. LPS는 다시 가장 안쪽에 있는 지질 A(Lipid A), 중간에 있는 core polysaccharide 그리고 가장 바깥에 있는 O-specified polysaccharide side chain이 있다. LPS에서 지질 A가 다른 생물막에있는 다른 지질과 구별되는 특징이 있고 분자의 특징적인 독성을 가지고 있다.

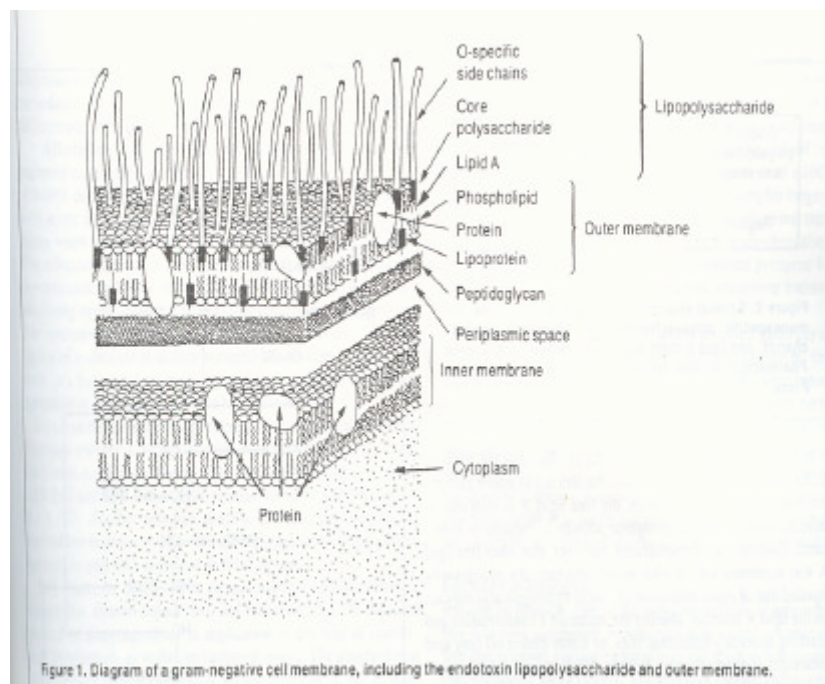


그림 1. 그람음성박테리아의 세포벽구조(외벽 : Lipopolysaccharide, LPS)

2. 건강상의 장해

엔도톡신의 독성은 크다. 엔도톡신 노출은 면역기능을 증강시키는 역할도 하지만 과민성 질환의 발생위험을 증가시킨다.

2.1 산업장

근로자에게 호흡기계질환을 초래할 정도로 높은 엔도톡신 농도에 근로자가 노출되는 산업은

- 면방직공장(cotton processing)
- 동물사육, 관리산업 : 농업
- 곡물관리산업
- 절삭유취급 산업 등이다.

엔도톡신에 대한 노출기준은 아직 설정되어 있지 않았다. 그러나 제안된 노출기준을 보면

- 1,000 - 2,000 EU/m³ : 노력성호기용량(Forced Expiratory Volume, FEV)에서 감소
- 5,000 - 20,000 EU/m³ : 열(fever)발생
- 90 - 1,800 EU/m³ : 영향이 없는 범위

순수한 LPS를 실험실 동물이나 사람에게 호흡기로 노출시켰을 때, 기도(airway)와 폐포염증(alveolar inflammation) 뿐만 아니고 가슴이 답답하고 열이 나며 불쾌함 등을 초래한다고 알려져 있다. 또한 20 ug의 LPS를 호흡기로 노출시켰을 때 기도에서 공기 흐름의 장애를 가져온다.

2개의 역학연구에서 관찰한 급성장해는 기도에서 공기흐름의 장애(airflow obstruction)이다. 이러한 장해는 면면지를 조사한 연구에서 나타난 결론이었으며 예상되는 노출농도는 300 - 400 EU/m³과 45-150 EU/m³이었다.

엔도톡신으로 인한 만성영향을 예방하기 위한 노출기준을 일부는 10 - 400 EU/m³이라고 주장하는 경우와 엔도톡신의 배경농도(100 EU/m³) 이상의 어떤 노출이라고 하는 경우가 있다. 그러나 이러한 역학연구들에서 기도에서의 공기 흐름의 급성장해 없이 폐기능에 만성적인 영향이 나타나거나 그 반대의 장해가 명백히 관찰되었다.

엔도톡신의 노출과 폐기능장해에 대한 양-반응관계는 연구에 따라서 차이가 있다. 이것은 아직까지 엔도톡신에 대한 노출을 정량적으로 측정하는 표준화된 방법이 설정되어 있지 않아 연구마다 보고된 농도들이 일정하게 또는 정확하게 측정되지 못한 경우가 있기 때문이다.

최근 1998년에 171명의 돼지사육장의 농부들에게서 정량적인 양-반응관계의 결과가 보고되었다. 즉 대수변환한 엔도톡신노출농도와 건강상의 장해의 관계에서 노출농도가 배로 증가하면 FEV_{1.0}(1초 동안의 노력성 호기량)이 년당 약 20 ml의 감소율을 나타낸다는 것이다(그림 참조). 그러나 400 EU/m³의 낮은 농도의 엔도톡신 노출에서조차도 일반 사람들에게서 예측된 FEV_{1.0} 감소율을 초과하였다. 농업산업에서 엔도톡신의 노출은 매우 복잡하고 유기먼지에서도 다른 인자들이 만성 혹은 급성건강상의 영향에 중요한 인자로 작용했을지도 모른다. 따라서 다른 산업에서 엔도톡신의 노출과 건강상의 영향과의 양-반응관계의 설정을 위한 연구가 필요하다. 엔도톡신에 대한 측정방법이 점차적으로 개선되고 있으므로 역학조사에서 만성적인 건강상의 장해에 대한 증거가 보다 많이 발견되리라 생각한다.

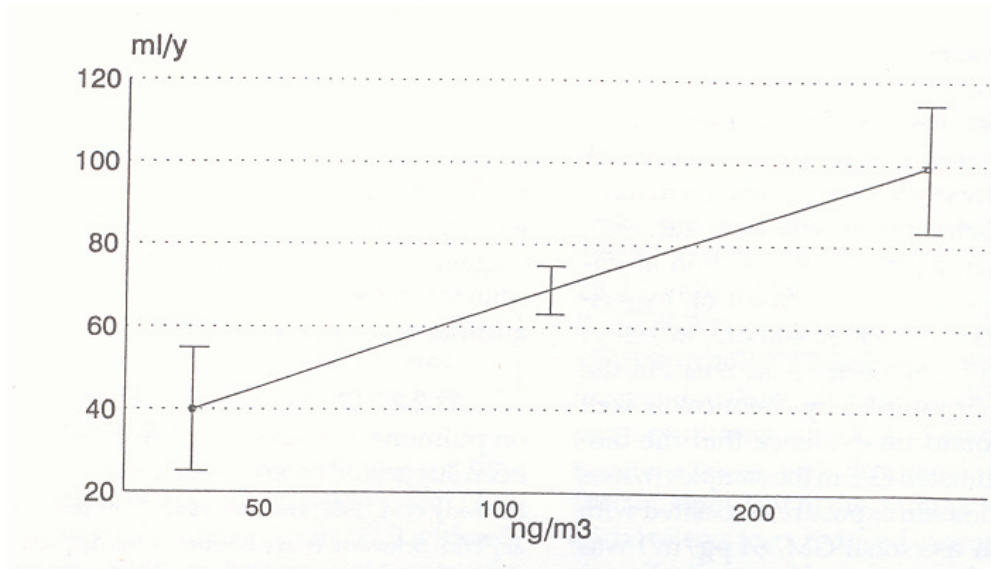


그림 2. 대수변환한 엔도톡신노출농도와 FEV1.0의 연중 감소율과 관계예측 : 나이, 흡연, baseline FEV1.0에 대한 보정을 함. 171명의 돼지사육 농부들을 대상으로 한 자료임

2.2 낮은 엔도톡신 노출과 BRS (Building Related Syndrome)

2.1항에서 설명한 농업이나 산업장에서의 엔도톡신 노출로서 45 EU/m³이상인 경우가 대부분이다. 그러나 일반 외부환경에서의 엔도톡신 노출보다 다소 높은 엔도톡신 노출에서 천식과 BRS의 심각성의 증가와 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

Michel 등(1996)은 먼지 1 mg당 1.1 ng의 엔도톡신이 채취된 가정의 어른들에게서 천식의 심각성이 증가되었다고 보고하였다. 고농도의 집먼지 진드기 항원에 노출된 천식이 있는 사람들은 집먼지에서 엔도톡신이 검출된 경우 천식의 심각성이 큰 것으로 보고하였다. 일반적으로 집먼지진드기 항원의 농도는 천식을 초래하는 것과 관련은 있지만 심각성과는 관련이 없었다.

엔도톡신의 노출농도가 0.2 ng/m³(2 EU/m³)인 경우 피로와 점막자극과 관련이 있다. 실내환경에서 보고된 가장 높은 노출농도는 18 ng/m³이었다. 보통 실외

에서 측정된 엔도톡신의 농도는 $0.04 - 4 \text{ EU/m}^3$ 의 범위인 것으로 알려져 있다.

1994년에서 수행된 대규모의 역학연구에서 엔도톡신 노출은 BRS와 관련이 있다고 보고하였다.

3. 엔도톡신 채취와 분석

3.1 시료채취

- Glass fiber나 Polycarbonate filter사용
- ASTM 방법에서는 Glass fiber필터를 제안

3.2 Extraction

- LAL water : endotoxin free

3.3 분석

- 표준용액 : E.coli 055 B5 Endotoxin
- Kinetic microplate reader(Vmax; Molecular Devices Corp., Menlo Park, Calif.)를 이용하여 분석
- 분석원리(그림 참조)

LAL(Limulus Amebocytes Lysate, LAL)에 들어있는 조효소(겔화되지 않은 효소: proenzyme)가 엔도톡신에 의해서 coagulase로 활성화된다. 이 효소가 LAL에 들어있는 응고성 단백질인 coagulin의 특정 결합을 가수분해시켜 coagulin이 되게 하고 이것이 겔형태의 응고물을 형성한다. 응고물이 탁도(Turbidity)인 OD(optical density, OD)로 표현되며 이것을 측정하는 것이 Kinetic LAL 분석방법의 원리이다. 즉 시료중에 엔도톡신이 많을수록 생성되는 coagulin이 많아진다. 분석시간에 따라 coagulin에 의해서 형성되는 OD농도

는 달라진다. 엔도톡신의 분석시간의 변화에 따른 OD의 농도변화를 이용한 것이다. 처음에는 OD가 서서히 증가하다가 일정 시점에서 OD가 급격히 증가되고 일정 시간이 지나면 더 이상의 활성은 일어나지 않는다. Kinetic방법을 이용한 엔도톡신의 정량은 설정된 OD에 도달하는(반응하는) 시간(reaction time)을 측정하는 것이다.

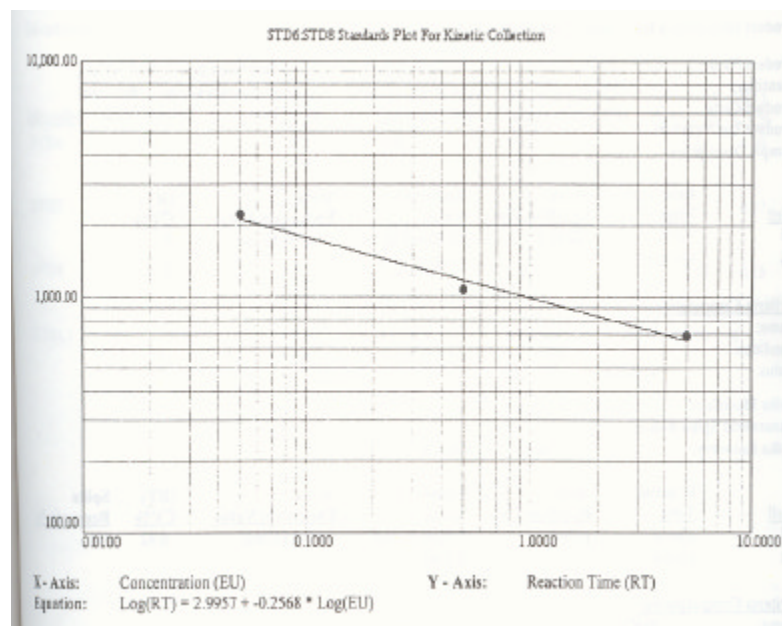


그림 3. 엔도톡신의 정량을 위한 표준곡선(검량선) : X축-대수변환한 엔도톡신의 농도, Y축-일정한 OD에 도달하는데 걸리는 대수변환한 시간