

PCR법에 의한 박테리아의 동정 및 오존과 UV에 의한 제거 연구

오병수 · 주 설 · 김경숙 · 강태희 · 이지영* · 이해영* · 강준원†

연세대학교 환경공학과

*연세대학교 임상병리학과

Monitoring of Bacteria using PCR Method and Inactivation with Ozone and UV

Byung-Soo Oh · Seul Ju · Kyoung-Suk Kim · Tae-Hee Kang · Ji-Young Lee* · Hye-Young Lee* · Joon-Wun Kang

Department of Environmental Engineering, Yonsei University

*Department of Clinical pathology, Yonsei University

Abstract : The purpose of this study was to monitor bacteria present in raw water and to investigate the effect of ozone, UV and combined ozone/UV processes for inactivating bacteria. Both polymerase chain reaction (PCR)-fragment length polymorphic analysis (PRA) and PCR-sequence analysis (PSA) were applied for the simultaneous analysis of numerous bacteria species present in each tested water, such as drinking water (DRW), drinking water source (DRWS) and sewage effluent water (SEW). According to the result, the number of detected bacteria species was zero in DRW, 58 in DRWS and 13 in SEW. After treatment of the each process, the ozone/UV process was the most successful for inactivating almost all bacteria. However, it was found that *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.* and *Beta proteobacterium sp.* had strong resistant to all tested processes, requiring further detailed study.

keywords : Bacteria, PCR, Monitoring, Inactivation, Ozone, UV

1. 서 론

병원성 세균이나 바이러스 등에 의해 오염된 음용수의 섭취로 인체의 위해성이 증가됨에 따라 선진국에서는 각종 원생동물 및 바이러스에 대한 모니터링 및 안전한 소독공정 개발 연구가 진행되고 있다. 우리나라에서도 이러한 문제점들에 대하여 중요성이 인식되고 있지만 체계적인 연구 및 보고는 아직 많지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 최근 분자 생물학 분야에서 널리 사용되고 있는 PCR (Polymerase Chain Reaction, 중합효소연쇄반응)방법을 수처리 분야에 적용하고자 하였으며 (Hidetoshi, 1999 ; Chang, 2002), 이러한 PCR 방법에 의하여 원수 내에 미량으로 존재하는 다양한 종류의 미생물을 동시에 검출할 수 있는 분석법을 확립하고자 하였다. 미생물 모니터링을 위한 PCR법의 원리를 Fig. 1에 도식화하였다. 이 PCR법은 목적하는 DNA영역을 사이에 둔 2종류의 primer를 사용하여 tube내에 연속적인 효소반응으로 증폭시키는 방법이다 DNA polymerase에 의한 주형특이적인 DNA 합성을 반복하여 목적하는 DNA 단편을 수십만배나 증폭시킬 수 있다.

현재 적용되고 있는 소독공정의 경우 다음과 같은 한계점을 안고 있다. 염소처리의 경우, 미생물의 불활성화를 위한 전형적인 공정으로 알려져 있지만 최근 염소소독 시 발생하는 냄새 문제 및 소독부산물인 trihalomethane과 haloacetic acid의 발생이 큰문제로 대두되고 있는 실정이다 (Bryant, 1992). 막에 의한 처리의 경우 시설비가 고가이며 미생물을 단지 분리해내는 방법이므로 분리된 미생물을 다시 처리해야 하는 2차적인 문제를 안고 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 한계점을 극복하고자 높은 소독효과로 알려져 있는 오존과 UV 공정을 평가하고자 하였다. 또한 대체소독 기법개발의 일환으로서 소독뿐만 아니라 높은 산화효과도 기대할 수 있는 오존/UV 공정을 적용하고자 하였다 (강, 1993).

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에 사용된 원수는 다양한 수원내에 대한 데이터를 확보하고자 W시의 상수원수 (Drinking Water Source, DRWS), 정수 (Drinking Water, DRW) 및 하수 처리장 방류수 (Sewage Treatment Plant Effluent Water, SEW)를 선정하였다. 상수원수의 경우, W시 정수처리장의 유입수로 사용되는 섭강의 표층에서 채수되었으며, 정수로는 W시 정수처리장의 처리수가 사용되었다. 하수 방류수는 W시 하수처리장의 최종방류수가 사용되었다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 대상원수의 미생물 분석

원수내 존재하는 다양한 미생물을 한번에 분석하기 위하

† To whom correspondence should be addressed.
jwkang@dragon.yonsei.ac.kr

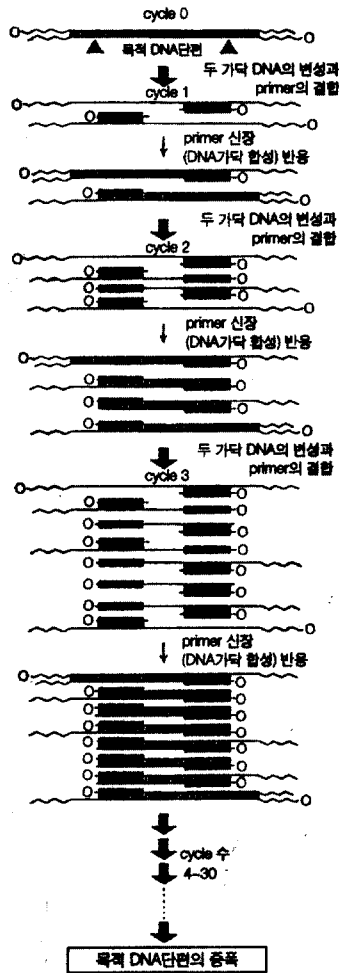


Fig. 1. Principle of RCR method.

여 PRA (PCR-fragment length polymorphic analysis)와 PSA (PCR-sequence analysis)의 두가지 방법 모두 사용되었다. PCR에 사용된 시료(DNA template)는 10 µg/L이었으며, 시료내 방해물질(inhibitor)의 존재를 알아보기 위하여 positive control으로서 *E.coli* 479(ATCC 35150)균주 3 µg/L도 함께 주입되었다. Primer (2 µg/L)와 Conventional PCR (Bioneer, Korea) 제품의 premix 용액(20 µg/L)을 증류수로 mass-up하여 전체 반응용액은 총 50 µg/L를 사용하여 실시하였다. PCR 증폭에 사용된 Perkin Elmer-2700 의 조건은 초기 denaturation 단계에서 94°C 2분을 유지하였으며, 45°C 1분 30초, 75°C 2분에서 25 cycle을 실시한 후, 최종 단계인 DNA 합성은 72°C에서 10분 동안 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 DNA band가 확인되었으며, One shot® chemical transformation kit를 이용하여 cloning 하였다. Cloning된 산물을 다시 증폭하여 각 colony에 대한 master plate를 제작하였다. Nucleotide sequence의 검출을 위하여 100 µg/L의 ampicillin이 포함된 LB(Luria-Bertani)media master plate에서 colony를 선택하여 배양 후 배양액을 harvest한 뒤 Plasmid extraction kit(Bioneer, Korea)를 이용해 plasmid DNA small-scale miniprep 과정을 수행하여 얻어진 DNA를 분석하였다 (Edwards, 1989).

2.2.2. 일반항목 분석

원수의 특성 및 배경 유기물질(Background organics)을 파악하기 위하여 pH, TOC, BOD₅, COD, UV₂₅₄ 값을 측정하였다. pH의 측정은 pH meter (Model 420A, Orion)를 사용하였으며, TOC는 Dohrmann DC-180 analyzer로 분석하였다. UV₂₅₄는 UV/VIS spectrophotometer (Varian Cary 3C)를 이용하였다.

2.2.3. 미생물 제거 실험

오존과 UV를 사용하여 미생물 제거 실험은 500 mL의 반회분식 반응기에서 수행되었다(이흥구, 2002). 오존은 고순도 산소를 이용하여 오존 발생기(Ozonias, CFS, USA)로부터 발생되었으며, 반응기내의 산기관을 통해 가스 상태의 오존이 주입되었다. 가스 상태의 오존은 flow meter를 이용하여 0.6 L/min의 일정한 유량으로 유지하였으며 주입오존 농도는 0.8 mg/L-min으로 조절하였다. 반응기는 UV조사가 용이하도록 중앙에 석영관을 부착하였고, low pressure Hg Arc. UV 램프를 사용하였다. UV 램프의 수용액 상에서의 intensity는 과산화수소 actinometry 방법에 의해 측정되었으며, 0.42 W/L임을 알 수 있었다 (Kang, 1997). 실제 오존 주입량은 5분 동안 4 mg/L가 되도록 하였으며, UV 조사시간도 이와 동일하게 5분 동안 수행되었다. 반응기에서 배출되는 오존 가스는 2% KI 용액으로 trap하여 반응하지 않고 배출되는 오존량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 일반적 수질특성

각 대상원수의 일반적인 수질 특성을 Table 1에 나타내었다. 각 대상원수의 pH는 6.6에서 7.3사이에서 큰 차이를 보이지 않았으며, TOC는 하수 방류수에서 다른 대상원수에 비해 2배에서 5배까지 다소 높은 값을 나타내었다. 주입된 오존 또는 UV조사는 원수내에 존재하는 미생물뿐만 아니라 유기물에 의해서도 소비되기 때문에 미생물의 불활성화 효율을 저감시키는 요인이 될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 다양한 원수를 대상으로 미생물의 불활성화 실험이 수행되었다.

Table 1. Water characteristics of raw water

| | pH | TOC (mg/L) | BOD ₅ (mg/L) | COD (mg/L) | UV ₂₅₄ (cm ⁻¹) |
|------|--------------|---------------|-------------------------|----------------|---------------------------------------|
| DRWS | 6.8 ~ 7.3 | 2.1 ~ 2.5 | — | — | 0.03 ~ 0.06 |
| DRW | 6.6 ~ 6.9 | 1.9 ~ 2.1 | — | — | 0.02 ~ 0.04 |
| SEW | 6.7 ~ 7.2 | 4.7 ~ 11.5 | 2.5 ~ 6.1 | 15.0 ~ 32.2 | 0.08 ~ 0.14 |

3.2. 대상원수 및 처리수의 미생물 동정

3.2.1. 대상원수내 미생물 동정

대상원수내에 존재하는 수인성 세균을 검출하기 위하여

모든 세균에 존재하는 16s rRNA 유전자 부위에서 모든 세균을 증폭시킬 수 있는 특정 primer를 Table 2와 같이 작성하였다.

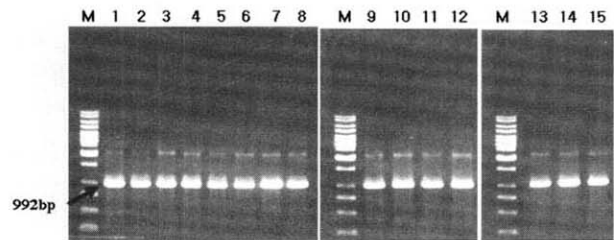
Table 2. 16s rRNA PCR Primer

| primer name | sequence | mer |
|---------------|---------------------------|-----|
| forward 519f | 5'-CAGCMGCCGCGTAATWC-3' | 18 |
| reverse 1492r | 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' | 19 |

※ 519f : 519-536 of *E.coli* 16s rRNA numbering

※ 1492r : 1510-1492 of *E.coli* 16s rRNA numbering

또한 제조된 PCR primer가 각종 세균을 증폭하는지의 여부를 확인하기 위해 각종 세균으로부터 추출된 DNA를 대상으로 PCR을 시행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Lane M은 DNA size marker를 의미하며 Lane 1부터 15까지는 다양한 세균을 나타낸다. 이러한 결과로부터 PCR증폭이 성공적으로 수행되었으며, primer가 적절하게 제조되었음을 확인하였다.



Amplified DAN run on 1% TBE gel. Lane M: DNA size marker (1kb Ladder; MBI, Germany); Lane 1-4: *E.coli* strains (STEC, EPEC, EHEC, EIEC), Lane 5: *P.aeruginosa*, Lane 6: *S.paratyphi-A*, Lane 7: *S.typhimurium*, Lane 8: *S.typhi*, Lane 9: *S.flexneri*, Lane 10: *S.sonnei*, Lane 11: *Y.enterocolitica*, Lane 12: *K. pneumoniae*, Lane 13: *Y.pseudotuberculosis*, Lane 14: *S.aureus*, Lane 15: *L.monocytogenes*

Fig. 2. Result of direct PCR for various bacteria species.

3.2.2. 처리수내 미생물 동정

Fig. 3에는 각 대상원수의 처리수에 대한 PCR 결과를 나타내었다. 각 대상원수에 PCR에 의하여 세균을 증폭하였을 때, 정수에서는 증폭된 산물을 보이지 않은 반면 상수원수와 방류수의 경우, 세균이 증폭되었음을 알 수 있었다. 특히 하수 방류수와 같이 유기물 오염정도가 비교적 높은 시

료의 경우, 여러 인자에 의하여 PCR이 억제될 가능성이 있으므로, 각 대상 시료수에 일정량의 세균(*E.coli*를 선택)을 spiking하여 시료에 PCR 반응의 억제자(inhibitor)가 있는지의 여부를 알아보았다. 이를 위하여 각 대상원수 단독으로 PCR을 실시하거나(S), 대상원수에 *E.coli*를 spiking하여 수행, 또는 *E.coli*만을 대상으로 PCR을 수행(P)하여 처리 전후의 상태를 비교하였다. 그 결과 방류수에서도 PCR 증폭이 성공적으로 일어나 PCR반응의 억제자가 존재하지 않음을 알 수 있었다. 이와 같이 direct PCR 증폭결과로부터 정수를 제외한 상수원수 및 하수 방류수에서 처리 전후의 S, S+P, P 모두에서 992bp에서 증폭되었음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 수중에 미생물의 존재여부의 확인은 가능하나 구체적인 미생물 종을 알아보기 위해서는 16s rRNA 부위의 염기서열에 대한 분석이 요구되었다.

Fig. 4 에서와 같이 염기서열에 대한 분석에 앞서 필요한 cloning과정에서 같은 세균에서 증폭된 PCR산물이 여러 개의 clone을 형성하므로 PCR로 증폭된 산물을 적절한 제한효소로 절단하여 같은 clone들로 그룹화 하였다.

PCR로 증폭된 산물을 제한효소로 절단하여 전기영동을 실시하면 서로 같은 DNA인 경우에는 잘린 양상이 유사하게 나타나지만, 서로 다른 DNA인 경우에는 잘린 양상이 다르게 나타나게 되어 서로 다른 세균으로부터 유래하였음을 알 수 있다. Fig. 3은 PCR 산물을 *HaeIII* 제한효소로 절단하여 전기영동을 실시한 후 dendrogram을 이용해 그룹화한 결과를 보여주고 있다. 20개의 colony를 선택한 후 동일한 양상을 보이는 2group-2,4,8,12,14 group과 16, 19 group을 구별해 낼 수 있었고 (그룹별 왼쪽에 표기된 수치들은 두개의 라인에 대한 유사성을 나타냄), 주입된 *E.coli*와 동일한 양상을 보이는 13과 17번 sample은 TOPO cloning kits의 vector primer를 이용해 PCR을 수행한 결과 유일한 vector로 판명되었다. 나머지 1,3,5,6,10,11,15,18,20은 각각 다른 양상을 보였다. 따라서 염기서열분석을 위해 1,2,3,5,6,7,10,11,15,16,18,20등 총 12개의 sample들로 분류하였다.

Fig. 4에서 그룹별로 분류된 sample에 대하여 각각의 염기서열 분석이 수행되었으며 얻어진 염기서열을 통하여 일치하는 염기서열을 갖는 미생물을 조사하는 과정(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi, www.firstmarket.com/cutter/

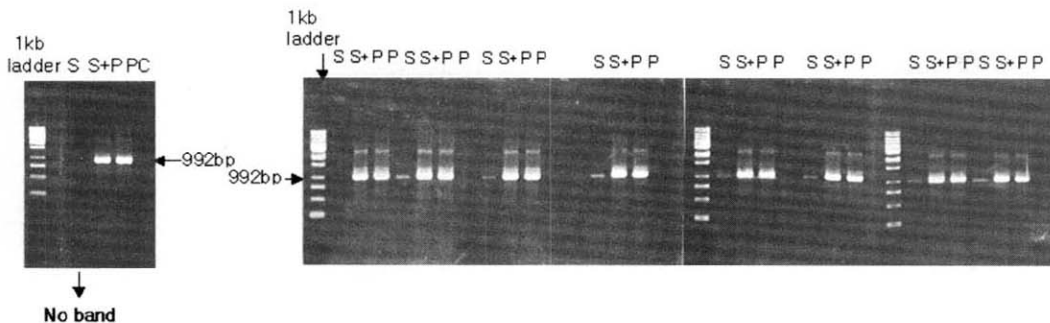


Fig. 3. Result of direct PCR for each test water before and after treatment with ozone, UV and ozone/UV processes.

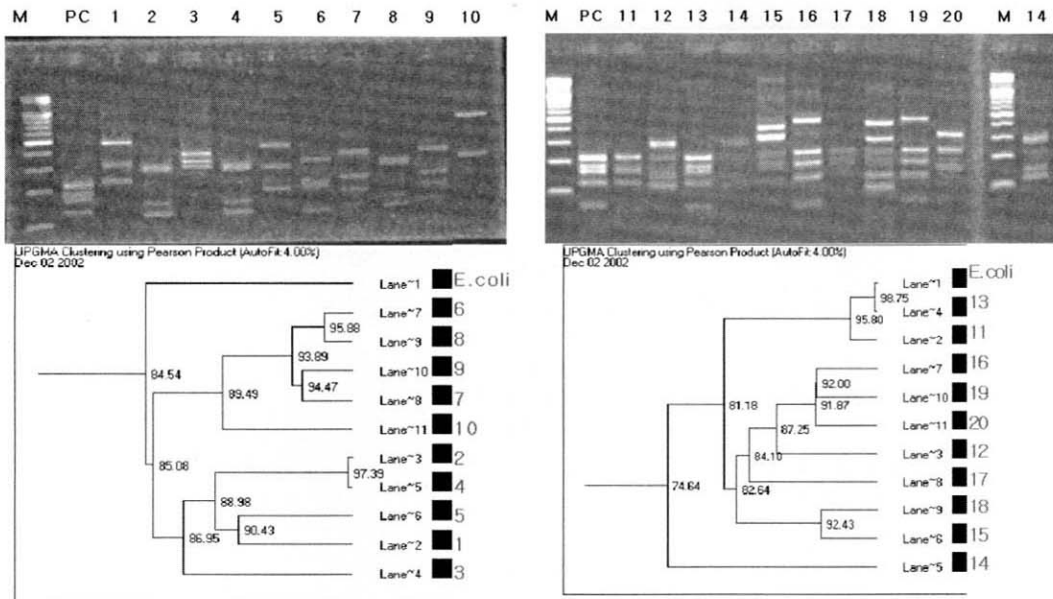


Fig. 4. Colony PCR products sected by Hae III and cendrogram.

cut2.html)이 수행되었다. 이러한 과정에 의하여 각 대상원수 및 처리수에서 존재하는 세균의 종류를 Table 3에 나타내었다. 각 대상원수를 처리하기 위한 실험 조건은 다음과 같다. 오존은 0.8 mg/L-min으로 5분동안 주입되어 총 주입된 오존 농도를 4 mg/L로 일정하게 하였다. 또한 UV 조사는 0.42 W/L의 intensity를 갖는 UV램프를 사용하여 총 5분 동안 조사되었다. 오존/UV 공정에서는 같은 조건에서 오존과 UV를 동시에 사용하였다. 결과를 살펴보면, 정수(DRW)의 경우 원수에서 아무런 세균도 검출되지 않았다. 반면 상수원수(DRWS)에서는 원수에서 58종의 세균이 검출되었으며 오존 처리수에서는 5종, UV 처리수에서는 7종, 오존/UV 처리수에서는 3종이 각각 검출되었다. 또한 하수 방류수의 경우 원수에서 13종의 세균이 검출되었으며, 오존 처리수에서 9종, UV 처리수에서 6종 그리고 오존/UV 처리수에서는 5종이 각각 검출되었다. 원수에서의 결과를 비교해볼 때, 상수원수에 비하여 하수 방류수에서 약 4배 정도의 적은 수의 세균 종이 검출되었다. 각 종에대한 정량적인 결과는 본 연구에서 제시하지 않았으나, 상수원수에 비해 하수 방류수에는 검출된 각 종에서 박테리아의 수가 비교적 많다는 것이 관찰되었다. 처리수에 대한 결과를 살펴보면, 상수원수와 하수 방류수 모두에서 오존/UV 공정에 의하여 세균의 제거효율이 가장 높다는 것을 알 수 있었다. 또한 *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Beta proteobacterium sp.*들이 오존, UV, 오존/UV 처리에 대하여 강한 저항력을 갖고 있다는 것을 알 수 있었다. 참고적으로 이러한 세균들의 특성은 다음과 같다. *Flavobacterium*은 고세균에 속하며 최근 다양한 수원에 존재하며 *Flavobacterium conlumnare*의 경우 세계전역에 서식하는 물고기중 최소 36종을 감염시킨다고 알려져 있다 (Plumb, 1994). *Pseudomonas aeruginosa*는 모든 조직에 대하여 치명적으로

감염시킬 수 있는 병원균으로 널리 알려져 있다 (Lyczak, 2000). 또한 *Beta proteobacterium sp.*는 지금까지 임상적 중요성은 보고 되지는 않았다. 특히 *Pseudomonas aeruginosa*는 인체에 유해하기 때문에 오존 및 UV에 의한 제거 효율에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

4. 결론

PCR법에 의하여 다양한 수원에 존재하는 세균들을 조사하였으며 오존, UV 및 오존/UV 복합처리 공정들에 의하여 처리한 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 1) 다양한 원수(상수원수, 정수 및 하수 방류수)내에 존재하는 세균을 검출하기 위하여 Polymerase Chain Reaction (PCR) 법을 효과적으로 적용하였다. PCR법에 의하여 각 원수내에 존재하는 다양한 세균 종을 한번에 검출 하는 것이 가능하였으며, 더 나아가 환경 분야에 관련된 수인성 세균의 검출에 보다 폭넓은 활용이 가능하리라 기대된다. 현재까지 문제점으로는 세균을 정량적으로 검출하는 것이 다소 복잡하여 보다 쉽게 접근하는 방법을 모색할 필요가 있으며 수인성 세균이외에 감염성이 없는 세균의 검출이 가능하기 때문에 이러한 단점도 보완해야할 필요성이 있다고 사료된다.
- 2) 각 세균을 검출한 결과, 정수에서는 검출된 세균이 없었으며 상수원수의 경우, 원수에서 58종, 오존 처리수에서 7종, UV 처리수에서 5종, 오존/UV 처리수에서는 3종이 검출되었다. 하수 방류수의 경우, 원수에서 13종, 오존 처리수에서 9종, UV 처리수에서 6종, 오존/UV 처리수에서는 5종이 검출되었다. 결과적으로 오존/UV가 다양한 세균을 제어하기위하여 가장 효과적인 공정으로 판명되었다.

Table 3. Kinds of survival bacteria present in DRW, DRWS and SEW with and without treatment by ozone, UV and ozone/UV processes

| Target water | | Numbers of bacteria sp. | Kinds of bacteria sp. | Similarity (%) of known sequences |
|------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| DRW | RW | | | |
| | | 0 | - | - |
| DRWS | RW | 58 | <i>Flavobacterium sp.</i> | 98 |
| | | | <i>Beta proteobacterium sp.</i> | 97 |
| | | | <i>Pseudomonas sp.</i> | 98 |
| | | | <i>Actinobacteria</i> | 99 |
| | | | <i>Haliscomenobacter hylrossis</i> | 98 |
| | | | <i>Thermodesulfabacteria</i> | 97 |
| | | | <i>Zoogloea sp.</i> | 96 |
| | | | <i>Comamonadaceae bacterium</i> | 97 |
| | | | <i>Gamma proteobacterium sp.</i> | 98 |
| | | | <i>Variovorax sp.</i> | 98 |
| | <i>Janthinobacterium sp.</i> | 99 | | |
| | Ozone | 5 | <i>Flavobacterium sp.</i> | 98 |
| | | | <i>Beta proteobacterium sp.</i> | 96 |
| | | | <i>Zoogloea ramigera</i> | 96 |
| | | | <i>Pseudomonas jessenii</i> | 97 |
| | | | <i>Gamma proteobacterium sp.</i> | 96 |
| | | | <i>Pseudomonas veronii</i> | 98 |
| | | | <i>Comamonadaceae bacterium</i> | 98 |
| | | | <i>Janthinobacterium lividum</i> | 97 |
| | | | <i>Variovorax sp.</i> | 97 |
| <i>Flavobacterium xinjiangense</i> | | | 97 | |
| UV | 7 | <i>Zoogloea ramigera</i> | 96 | |
| | | <i>Beta proteobacterium sp.</i> | 96 | |
| | | <i>Flavobacterium sp.</i> | 98 | |
| | | <i>Pseudomonas sp.</i> | 98 | |
| Ozone/UV | 3 | <i>Beta proteobacterium sp.</i> | 95 | |
| | | <i>Flavobacterium sp.</i> | 99 | |
| | | <i>Beta proteobacterium sp.</i> | 98 | |
| SEW | RW | 13 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 98 |
| | | | <i>Zoogloea sp.</i> | 97 |
| | | | <i>Gamma proteobacterium sp.</i> | 96 |
| | | | <i>Janthinobacterium sp.</i> | 97 |
| | | | <i>Comamonadaceae bacterium</i> | 98 |
| | | | <i>Flavobacterium sp.</i> | 99 |
| | | | <i>Beta proteobacterium sp.</i> | 98 |
| | Ozone | 9 | <i>Gamma proteobacterium sp.</i> | 96 |
| | | | <i>Pseudomonas sp.</i> | 97 |
| | | | <i>Zoogloea sp.</i> | 96 |
| | | | <i>Janthinobacterium sp.</i> | 95 |
| | | | <i>Flavobacterium sp.</i> | 98 |
| | UV | 6 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 97 |
| | | | <i>Janthinobacterium sp.</i> | 97 |
| | | | <i>Comamonadaceae bacterium</i> | 98 |
| | | | <i>Pseudomonas sp.</i> | 97 |
| | Ozone/UV | 5 | <i>Flavobacterium sp.</i> | 98 |
| | | | <i>Beta proteobacterium sp.</i> | 97 |
| | | | <i>Beta proteobacterium sp.</i> | 97 |

3) *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Beta proteobacterium sp.*들이 오존, UV, 오존/UV 처리에 대하여 강한 저항력을 보였으며, 이에 대하여 보다 세밀한 처리 실험이 요구되었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초 연구 (R01-2002-000-

00313-0)지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 강준원, 오존, 과산화수소, UV를 이용한 고급산화공정의 kinetic에 관한 연구(1), *대한환경공학회지*, 15(2), pp. 501-510 (1993).

2. 이흥구, 이경혁, 박종복, 강준원, 하수처리장 방류수 재이용을 위한 고급산화공정 평가, *대한환경공학회지*, **24**(12), pp. 2175-2182 (2002).
3. Bryant, E. A., Fluton, G. P. and Budd G. C., *Disinfection alternatives for safe drinking water*, Van Nostrand Reinhold, New York. USA., pp. 71 (1992).
4. Chang, C. T., Wang, L. Y., Liao, C. Y. and Huang, S. P., Identification of Nontuberculous Mycobacteria Existing in Tap Water by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(6), pp. 3159-3161 (2002).
5. Edwards, U., Rogall, T., Bloecker, H., Emde M. and Boettger, E. C., Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes characterization of a gene coding for 16s ribosomal RNA, *Nucleic Acids Res*, **17**, pp. 7843-7854 (1989).
6. Hidetoshi, U., Kumito, K.T. and Kouichi, O., Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis, *Microbiology*, **145**, pp. 3305-3315 (1999).
7. Kang, J.W. and Lee, K.H., A kinetic model of the H₂O₂/UV process for the treatment of hazardous waste chemicals, *Environ. Eng. Sci.*, **14**(3), pp. 183-192 (1997).
8. Lyczak, J. B., Cannon, C. L. and Pier, G. B., Establishment of pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist, *Microbes and Infection*, **2**, pp. 1051-1060 (2000).