

활성슬러지 구성 미생물에 의한 폴리오바이러스의 감소 효과

김태동[†] · 최동혁

국립안동대학교 환경공학과

Poliovirus Decrease Effect by Activated Sludge Microbes

Tae Dong Kim[†] · Dong Hyuk Choi

Department of Environmental Engineering, Andong National University

(Received May 8, 2006/Accepted August 18, 2006)

ABSTRACT

The biological wastewater treatment system is known to have an important role in reducing the quantity of enteric virus in water environments. To clarify the roles of activated sludge microbes in decreasing the virus infectivity, the behavior of the virus in bacteria, protozoa, and metazoa was examined by pure or mixed culture system using poliovirus type 1 (Lsc, 2ab strain). In the bacterial culture systems, the virus infectivity in the liquid phase decreased by a reversible adsorption of the virus to the bacteria or bacterial flocs. On the other hand, in the protozoa and the metazoa culture systems using *T. pyriformis* and *P. erythrophthalma*, respectively, with a variety of bacterial strains as prey, the main virus decrease mechanism of reversible adsorption in early stage was changed to irreversible predation, which was not eluted in this study. The virus decrease was more effective in the *P. erythrophthalma* culture system, which had high predation and floc forming abilities. However, in the mixed culture system of *Z. ramigera* and *P. erythrophthalma*, the more rapid reversible adsorption of virus to *Z. ramigera* flocs preceded the irreversible predation of *P. erythrophthalma*.

Keywords: activated sludge, poliovirus, behavior of virus, bacteria, protozoa, metazoa

I. 서 론

최근 인간생활에 관여하는 거의 모든 수계에 바이러스가 혼입되어 있는 것이 밝혀졌다.¹⁻⁶⁾ 이러한 사실은 수계전파에 의해서 인간에게 바이러스성 질병을 집단적으로 유발시킬 수 있는 가능성을 시사하는 것으로 그 사회적인 영향을 고려하면 시급히 해결해야 할 중대한 문제이다. 더욱이 지금까지 원인 불명이었던 일부의 수인성 전염병이 바이러스가 원인인 것으로 판명되고 있다.⁷⁻⁹⁾ 이러한 상황에서 선진국을 중심으로 수환경 중의 바이러스에 대한 실태조사와 함께 검출 방법의 개발, 수처리 프로세스에서의 바이러스의 거동 등에 대한 연구가 진행¹⁰⁻¹⁴⁾되고 있으나 우리나라에서는 이 분야에 대한 연구는 물론이거니와 실태 파악조차 거의 되어 있지 않은 실정이다.

본 연구에서는 활성슬러지를 구성하고 있는 미생

물 가운데 플록 형성균으로 알려진 *Zooglea ramigera* 를 포함한 세균과 이들 세균을 포식하는 원생동물(*Tetrahymena pyriformis*) 및 후생동물(*Philodina erythrophthalma*)을 이용하여, 활성슬러지법에 의한 하수처리프로세스의 폭기조내에서의 바이러스제거 메커니즘을 파악하는 것을 목적으로, 각 미생물의 순수 배양계 및 혼합 배양계에서의 바이러스 제거과정에 대하여 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 미생물과 배지

실험에 사용한 미생물은 활성슬러지로부터 분리한 *Zooglea ramigera*를 비롯한 *Pseudomonas putida*, *Achromobacter cycloclastus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiera pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Flavobacterium luteus*의 총 11종류의 세균과 *Tetrahymena pyriformis*, *Philodina erythrophthalma*을 이용하였다. 상기 미생물의 배지로는 LE

[†]Corresponding author : Department of Environmental Engineering, Andong National University
Tel: 82-54-820-5895, Fax: 82-54-820-6187
E-mail : tdkim@andong.ac.kr

배지¹⁵⁾를 사용하였으며 *Z. ramigera*는 Tryptic soy broth(Difco)를 이용하였다. 한편 장관계 바이러스의 모델로는 환경수 중에서 고 빈도로 검출되고 취급이 용이한 폴리오 바이러스 1형의 백신주(Lsc, 2ab주)를 사용하였다.

2. 미생물 배양방법

상기 10종류의 세균의 배양은 LE 배지, *Z. ramigera*의 배양은 Tryptic soy broth를 이용하였다. 각각의 한천배지에 보존한 미생물을 27°C, 100 rpm으로 1일간 진탕하여 전배양을 행한 후 배양액 소정량을 200 ml의 신선배지에 식중하여 동일조건으로 진탕 배양하였다. 원생동물과 후생동물의 배양은 먹이로 이용되는 상기 세균 함유 배양액 200 ml를 500 ml의 배양기에 넣고 *T. pyriformis*는 80-100개체/ml, *P. erythrophthalma*는 5-10개체/ml이 되도록 일정용량을 식중하여 배양하였다. 한편, 순수 배양계에서의 세균은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 외관상 플록을 형성하는 균과 플록을 형성하지 않는 균으로 나누어 실험을 행하였으며 배양액과 점액질층 등의 현미경 관찰로 플록형성 여부를 확인하였다.

3. 바이러스 접촉실험

용량 500 ml의 미생물 배양기에 세균, 원생동물, 후생동물을 정상상태에 도달할 때까지 각각 배양한 후 폴리오바이러스를 10,000 plaque forming unit/ml(PFU/ml)가 되도록 첨가한 후 7시간에 걸쳐 일정한 시간 간격으로 혼합액을 5 ml씩 채취하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액과 침전물로 분리하고 상등액은 공경 0.22 µm 필터로 여과하여 용액중에 잔존하는 바이러스 농도를 측정하기 위한 시료로 하였다. 한편 침전물은, 3% beef extract와 1M의 질산나트륨이 함유

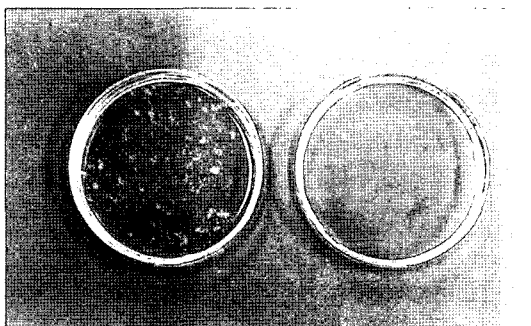


Fig. 1. Comparison between floc-forming and floc-unforming bacteria.

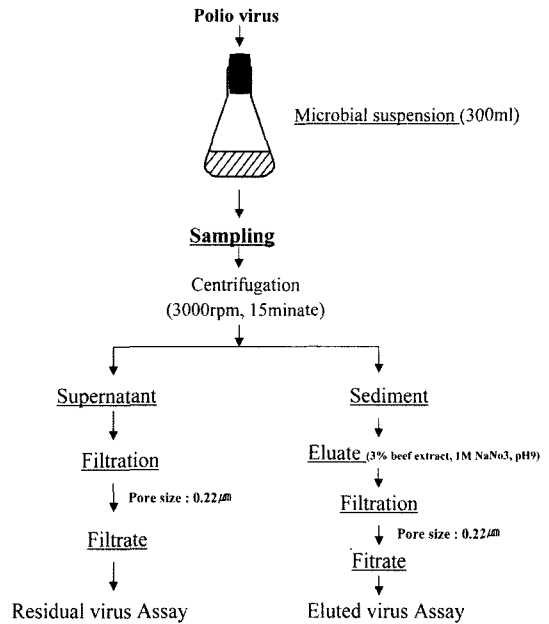


Fig. 2. Procedure of virus assay.

된 유출액을 4.5 ml 첨가하여 혼합하고 Millex-GV (0.22 µm 필터)로 여과한 후 시료로 하였다. 실험과정은 Fig. 2에 나타내었다. 채취한 시료는 항생물질이 함유된 멸균 튜브에 넣어 -20°C에 보존하여 7일 이내에 바이러스 정량분석을 실시하였다. 한편 대조실험을 위하여 신선한 배지를 이용하여 동일조건에서 실험을 하여 -20°C에 보존하여 바이러스를 정량하였다.

4. 바이러스 정량분석

바이러스의 정량은 폴리오바이러스에 대하여 감수성이 높은 buffalo green monkey kidney (BGM) 세포를 이용하였으며,¹⁶⁾ BGM 세포의 배양은 Table 1에 나타낸 배지를 이용하였다. 배지의 조제는, 120°C에서 15분 고압증기 멸균한 Broth B를 수욕상에서 56°C로 냉각시킨 후 Broth A와 혼합하여 37-38°C로 조정하였다. 바이러스 정량을 위한 시료는 Eagle's minimal

Table 1. Composition of agar medium for virus quantification

Broth A (2.5% agar)	Broth B (MEM 2)	
Agar 2.5 g	MEM without phenol red(x2)	100 ml
	L-Glutamine	2 ml
Distilled Water 100 ml	Antibiotic solution	2 ml
	FBS	2 ml
	7.5% NaHCO ₃ Solution	4.5 ml

essential medium(MEM)에 fetal bovine serum(FBS)을 1% 첨가한 세포유지액을 이용하여 10배씩 단계적으로 희석하여 BGM 세포가 단층 배양된 6 well plate에 1 ml 접종한 후 바이러스가 세포에 정착되도록 37°C 항온 배양조에서 90분간 정치 배양하였다. 정착된 세포를 PBS로 세정한 후 한천배지 3 ml를 첨가하여 항온 CO₂ 배양조에서 3일간 배양하였다. 3일 후 3% 페놀레드 염색액을 첨가하면, 살아있는 세포는 적색으로 착색되고 바이러스가 감염된 세포는 착색이 되지 않는 plaque을 형성하는데 이들 plaque 수(PFU/ml)로 바이러스를 정량하였다.¹⁷⁾

III. 결과 및 고찰

1. 순수 세균배양계에서의 바이러스 거동

1) 비플록형성균

플록을 형성하지 않는 *P. putida* 및 *M. luteus*의 배양계에서의 바이러스의 거동을 Fig. 3에 나타내었다. 대조 실험계에서의 바이러스 감소는 거의 보이지 않았으나 세균 배양계에서는 상등액에서 바이러스가 감소하는 것을 볼 수 있었다. *P. putida* 배양계에서는 반응시간 1시간에서 초기 바이러스의 약 30% 농도가 감소하

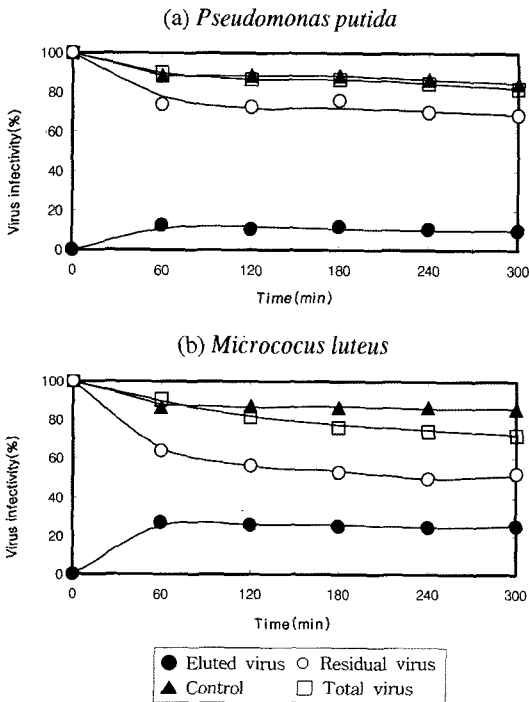


Fig. 3. Behavior of virus in non-floc forming bacteria culture systems.

였다. 그러나 상등액에서 제거된 바이러스는 거의 유출됨으로써, 반응액에 잔존하는 바이러스와 세균상에서 유출한 바이러스의 총량은 대조액에서의 바이러스량과 거의 같았다. 한편, 구균인 *M. luteus*의 배양계의 경우는 *P. putida* 배양계와 비교할 때 반응액의 잔존 바이러스가 약 20% 정도 감소하는 것으로 나타났다. 또한 바이러스 총량에 있어서도 초기 1시간 동안은 대조군과 같은 정도였으나, 그 이후에는 약 15% 낮은 값을 보였다. 한편 반응시간 1시간 이후에 유출물은 일정한 것으로 보아, *M. luteus*와 바이러스 사이에 본 연구의 유출조건으로는 유출되지 않는 강력한 상호작용이 존재하는 것으로 사료된다.

2) 플록형성균

플록을 형성하는 세균인 *K. pneumoniae* 배양계의 바이러스 거동을 Fig. 4에 나타내었다. 접촉시간 1시간 사이에 상등액으로부터 초기 바이러스량의 약 40% 이상이 감소하여 최종적으로 50%의 높은 감소율을 나타내었다. 이 결과 플록을 형성하지 않는 세균에 비하여 플록을 형성하는 세균이 상등액 중의 바이러스 제거능력이 높은 것을 알 수 있었다. 또한 총 바이러스량은 시간이 경과함에 따라 서서히 감소하였는데 이는 상기 *M. luteus*의 경우에서 고찰한 바와 같이 세균과 바이러스 사이에 존재하는 강력한 결합력과, 플록 형성과정에서 바이러스 입자가 플록 사이에 매몰되어 유출되지 않은 바이러스가 많았기 때문인 것으로 사료된다. 플록형성과 바이러스제거의 연관성을 검토하기 위하여 활성슬러지 미생물 가운데 대표적인 플록형성균으로 알려진 *Z. ramigera*을 이용한 바이러스 접촉 실험결과를 Fig. 5에 나타내었다. 실험한 모든 농도계에서 잔존 바이러스량은 상기 플록형성 세균인 *K. pneumoniae*의 배양계에서와 같이 접촉시간 1시간까지 감소하였으며 그 이후의 감소는 거의 없었다. 또한 감소한 바이러스

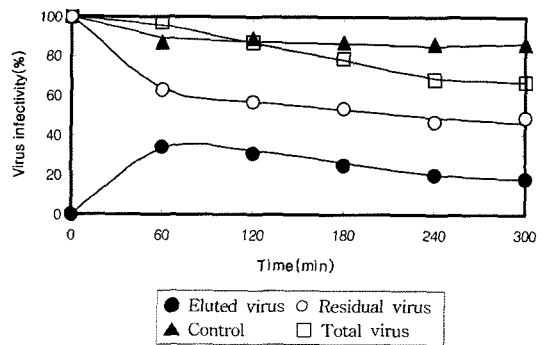


Fig. 4. Behavior of virus in floc forming *K. pneumoniae* culture system.

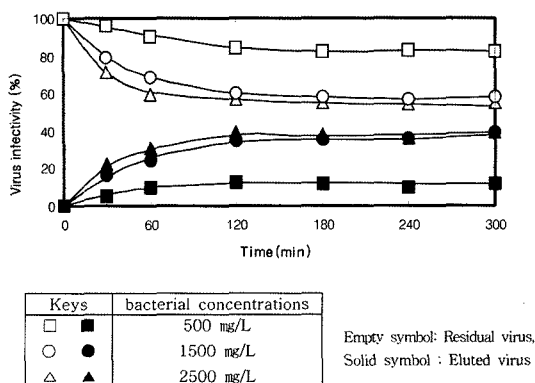


Fig. 5. Behavior of virus in floc forming *Z. remigera* culture system.

에 해당하는 양이 *Z. remigera*의 플록으로부터 유출되었으 며 미생물 농도가 높은 경우 바이러스 제거효과가 높은 것으로 나타났다. 이는 *Z. remigera*의 농도가 높을수록 *Z. remigera*와 바이러스의 접촉하는 기회가 많 아지고 결과적으로 바이러스가 상등액에서 플록으로 이 동하는 양이 많아지기 때문인 것으로 판단된다.

이상의 결과에서 세균에 의한 바이러스 제거는 세균 또는 세균 플록 표면에 대한 바이러스의 흡착에 의한 것이며, 흡착된 바이러스의 대부분은 적절한 유출액으 로 유출될 수 있는 물리화학적인 흡착이 지배적인 것 으로 판단된다. 또한 바이러스의 제거에는 세균의 플록 형성 능력과 농도가 중요한 요인임을 알 수 있었다.

2. 원생동물 및 후생동물 배양계에서의 바이러스 거동

활성슬러지 공정에서 출현하는 미생물 가운데 분산 세균을 섭취하는 것으로 알려진 *T. pyriformis*와 *P. erythrophthalma* 배양계에서의 바이러스의 거동을 검토 하였다. 이들 두 미생물의 섭취 세균은 *Z. remigera* 를 제외한 10종의 세균을 이용하였다. Fig. 6과 Fig. 7은 각 미생물이 정상상태에 도달하였을 때의 바이러스 제거과정을 농도별로 나타낸 것이다. 두 배양계 모두 미생물의 수가 많을수록 상등액의 바이러스 제 거가 효과적이었다. 한편, *P. erythrophthalm* 배양계 가 *T. pyriformis* 배양계보다 미생물의 개체수가 적 음에도 불구하고 바이러스 제거 효과가 높은 것은 *P. erythrophthalma*가 *T. pyriformis*보다 강력한 포 식능력을 지니며 큰 흡입구를 가져 큰 세균 플록의 포식에 유리하기 때문인 것으로 사료된다.¹²⁾ 또한 *P. erythrophthalma* 배양계에서 세균상으로부터 유출된 바 이러스량이 많은 것은 *T. pyriformis* 배양계에서는 플록 의 형성이 거의 없는 분산세균이 많은데 비하여 *P.*

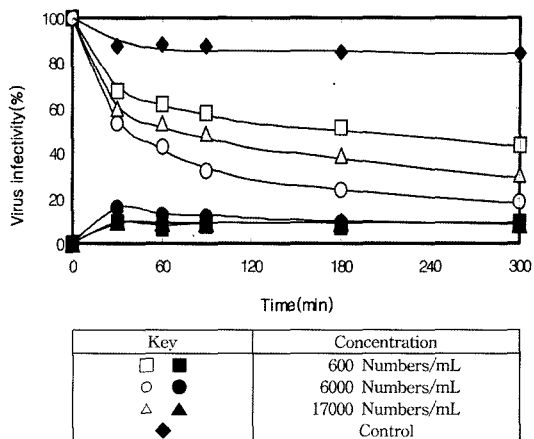


Fig. 6. Behavior of virus in *T. pyriformis* culture system.

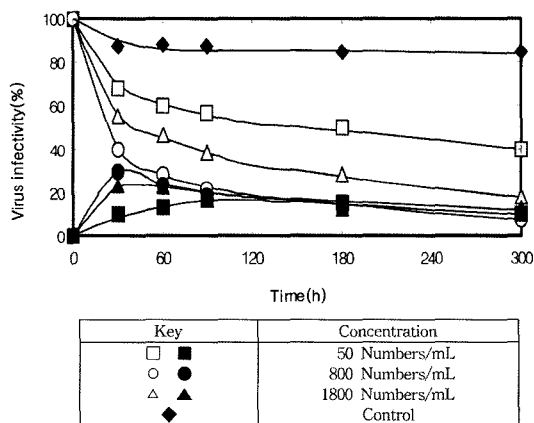


Fig. 7. Behavior of virus in *P. erythrophthalma* culture system.

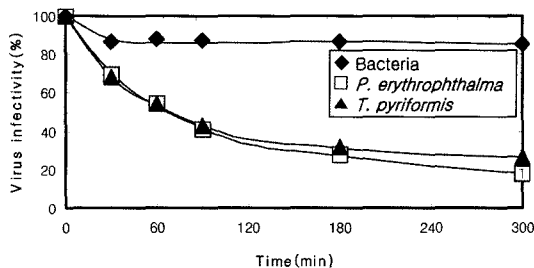


Fig. 8. Comparison of total virus variation among bacteria, *P. erythrophthalma*, and *T. pyriformis* culture systems.

erythrophthalma 배양계에서는 점성물질의 배출에 의한 플록 형성능이 높아 다른 미생물에 비하여 세균상에 흡착하는 바이러스량이 많기 때문인 것으로 판단된다.

Fig. 8은 각 배양계에서 검출된 바이러스의 총량을 나타내었다. 세균 배양계에 비교하여 이들 미생물 배양

계에서는 배양액으로부터 회수한 바이러스량이 크게 감소하는 것으로 나타나 세균 배양계의 바이러스 거동과 다른 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 미생물의 포식 작용이 주 원인으로 사료된다. 바이러스 첨가 직후 잔존 바이러스의 급격한 감소는 유출 바이러스의 급격한 증가를 고려할 때 미생물 또는 세균 플록 표면에 바이러스가 흡착하기 때문인 것으로 판단된다.

3. *Z. ramigera* 배양액과 *P. erythrophthalma* 배양액의 혼합배양계에서의 바이러스 거동

혼합배양계에서 미생물에 의한 바이러스의 제거 기작을 검토하기 위하여 활성슬러지 미생물 가운데 대표적인 플록 형성균으로 알려진 *Z. ramigera*와 바이러스 제거 능력이 좋은 *P. erythrophthalma*의 혼합배양계에서 바이러스의 거동을 연구하였다. 연구결과 *Z. ramigera* 배양에 사용한 Tryptic soy broth에서는 *P. erythrophthalma*가 증식하지 않았고, *Z. ramigera*는 *P. erythrophthalma* 배양에 사용한 LE 배지에서는 거의 증식하지 않았다. 따라서 혼합배양이 어려워 *Z. ramigera* 배양액과 *P. erythrophthalma* 배양액을 1:2 비율로 혼합한 배양계에 바이러스를 첨가하여 시간변화에 따른 영향을 살펴보았다. Fig. 9는 바이러스를 첨가하여 시간이 경과함에 따른 바이러스의 배양액내 잔존률과 미생물상으로부터 유출한 유출률을 나타내었다.

Z. ramigera 배양 혼합액에 비하여 *P. erythrophthalma* 배양계에서 바이러스의 잔존률의 저하가 2배 이상으로 나타났으나 바이러스의 유출량은 동일하였다. 이는 *Z. ramigera* 배양계에서의 바이러스 제거는 *Z. ramigera* 플록 표면에 대한 흡착에 의한 것이며, *P. erythrophthalma* 배양계의 경우, 흡착 이외의 포식작용과 같은 기작에 의한 바이러스 제거 효과가 크기 때문인 것으로 판단된다.

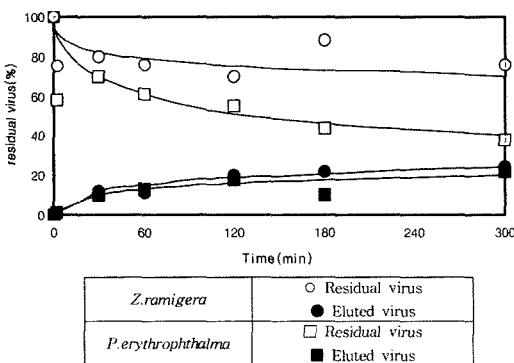


Fig. 9. Behavior of virus in the mixed culture broth of *Z. ramigera* and *P. erythrophthalma*.

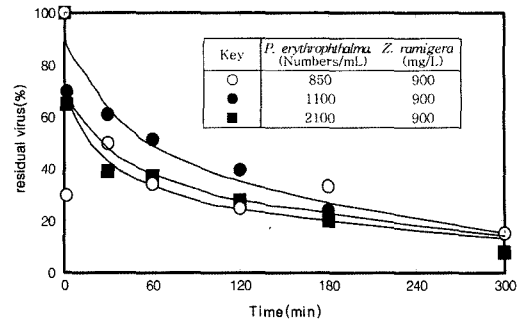


Fig. 10. Variation of residual virus in the mixed culture broth of *Z. ramigera* and *P. erythrophthalma*.

Fig. 10은 *Z. ramigera*와 *P. erythrophthalma*의 혼합배양계에서 미생물 농도별 바이러스 잔존률의 변화를 나타내었다. 각각 단독 배양계의 바이러스 잔존률로부터 제거율(100-잔존률)을 계산하여 이들을 합하여 두 미생물에 의한 제거율로 하고, 이로부터 잔존률(100-제거율)을 산정하여 나타내었다. 혼합배양계에서는 단독배양계의 계산값에 비교하여 바이러스 잔존률의 감소가 낮게 나타났으나 최종적으로 같은 정도의 값을 보였다. 또한 혼합배양시 *P. erythrophthalma*의 농도가 높을수록 초기에는 제거 효과가 높은 것으로 나타났으나 최종적으로는 동일한 값을 보였다.

Fig. 11에 Fig. 10의 각 배양계의 미생물상으로부터 유출된 바이러스의 시간적 변화를 나타내었다. 단독배양계의 계산값에 비하여 혼합배양계에서의 유출률이 높으며, *P. erythrophthalma*의 농도가 높을수록 유출률이 높았다. 즉, 단독계에서는 *P. erythrophthalma*의 포식작용과 같은 유출 불가능한 기작에 의한 제거작용이 크게 기여하는 것으로 판단되었으며, *Z. ramigera*와의 혼합배양계에서는 표면 흡착 등 유출 가능한 제거 기

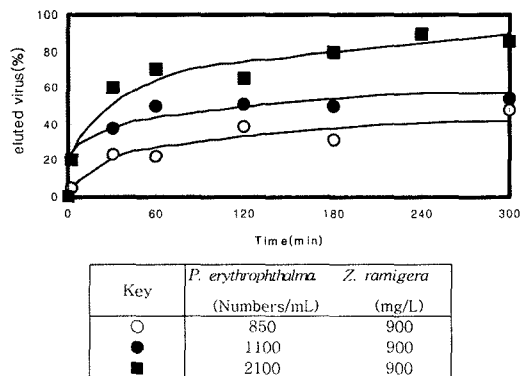


Fig. 11. Variation of eluted virus in the mixed culture broth of *Z. ramigera* and *P. erythrophthalma*.

작이 상당부분 작용하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Z. ramigera*가 플록을 형성하는 균으로서 형성된 플록의 크기가 커서 *P. erythrophthalma*에 의해 포식되기 어렵고 *P. erythrophthalma* 존재시 점액성 분비물에 의하여 플록형성능이 향상되어 결과적으로 플록으로 이동한 유출 가능한 바이러스의 양이 증가하였기 때문인 것으로 사료된다.¹⁵⁾

IV. 결 론

활성슬러지를 구성하는 세균, 원생동물, 후생동물의 각 미생물의 순수 배양계 및 혼합 배양계에서의 바이러스 제거과정에 대한 연구 결과 세균에 의한 바이러스 제거는 세균 또는 세균플록 표면의 바이러스 흡착이 지배적이며 농도가 높을수록 바이러스 감소능력은 크게 나타났다. 흡착된 바이러스의 대부분은 적절한 유출액으로 유출할 수 있는 물리 화학적인 흡착임을 알 수 있었다. 세균을 여과 섭취하는 *T. pyriformis* 혹은 *P. erythrophthalma*와 세균간의 각각의 혼합 배양계에서 바이러스 제거는 초기단계 급격히 감소한 후 서서히 감소하는 경향을 보였다. 바이러스의 제거효과는 여과포식능력이 크고 점성물질에 의한 플록 형성능이 높은 *P. erythrophthalma* 배양계의 경우가 효과적인 것으로 나타났다. 또한 *Z. ramigera*와 *P. erythrophthalma*의 혼합배양계에 대한 바이러스의 제거 효과도 큰 것으로 나타났다. 그러나 배양계에서 *Z. ramigera* 플록에 대한 유출 가능한 흡착에 의한 바이러스의 제거효과가 빠르기 때문에 *P. erythrophthalma*에 의한 포식 작용과 같은 유출되지 않은 작용에 의한 바이러스의 감소는 상대적으로 적은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2001-000-01248-0) 지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. Coin, L. : Modern microbiological and virological aspects of water pollution. In *Advances in Water Pollution Research*, Pergamon Press, London, 1-10, 1966.
2. Sobsey, M. D., Shields, F. H., Hauchman, F. H., Hazard, R. L. and Caton, L. W. III : Survival and transport of hepatitis-A virus in soils ground water and wastewater. *Water Science and Technology*, **18**, 97-106, 1986.

3. Gerba, C. P. and Rose, J. B. : Viruses in Source Water and Drinking Water, *Drinking Water Microbiology: Brok/Springer Series in Contemporary Bioscience*, McFeter, G. A. (Ed.), Spring-Verlag, New York, 380-396, 1990.
4. Young, D. C. and Sharp, D. G. : Poliovirus aggregates and their survival in water. *Applied and Environmental Microbiology*, **33**, 159-167, 1977.
5. US Environmental Protection Agency (US EPA), Bitton, G. : Server of Virus Isolation Data from Environmental Samples, 1985.
6. Chung, H., Oh, S. and Park, J. : Seasonal variation of total culturable viruses and indicator bacteria in drinking water sources. *Journal of Korean Society on Water Quality*, **19**, 329-338, 2003.
7. Kurtz, J. K. and Norval, M. : Nucleic acid probes in diagnosis of viral diseases of man and brief review. *Archives of Virology*, **83**, 3-15, 1985.
8. Dolin, R., Treanor, J. J. and Madore, P. : Novel agents of viral gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases*, **155**, 365-371, 1987.
9. Kaplan, J. E., Gary, G., Baron, R. C., Singh, N., Schonberger, L. B., Fieldman, R. and Greenberg, H. B. : Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and role of Norwalk virus in outbreaks of acute non-bacterial gastroenteritis. *Annals of Internal Medicine*, **96**, 757-761, 1982.
10. Yano, K., Hayashi, Y., Yabuuchi, K. and Taguchi, F. : Conditions for concentrating poliovirus from sewage sludge. *Water and Waste*, **28**, 281-287, 1986.
11. Irving, L. G. and Smith, F. A. : One-year survey of enteroviruses, adenovirus and reoviruses isolated from effluent of an activated sludge purification plant. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**, 50-60, 1981.
12. Kim, T.-D., Shiragami, N. and Unno, H. : Development of a model describing virus removal process in an activated sludge basin. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **28**(3), 257-262, 1995.
13. Kim, T.-D., Honda, H., Unno, H., Shiragami, N. and Yano, K. : Efficient conditions for the elution of poliovirus transferred to activated sludge. *Journal of Japan Society on Water Environment*, **17**(8), 509-516, 1994.
14. Payment, P., Trudel, M. and Plante, R. : Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 1418-1428, 1985.
15. 稻森 悠平 : 生物處理における微小後生動物の役割に関する研究, 日本水處理生物學會誌, **23**, 15-23, 1987.
16. Dahling, D. R. and Wright, B. A. : Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **51**, 790-812, 1986.
17. 日本藥學會 : 衛生試驗法・注解2000, 金原出版株式會社, 126-131, 2000.