Journal of Life Science 2009 Vol. 19. No. 3. 373~377 ©JLS / ISSN 1225-9918

수계 바이러스의 정수처리공정별 제거율 및 세포주별 감염특성 조사

정은영* · 박홍기 · 차동진 · 정미은 · 유평종

부산광역시 상수도사업본부 수질연구소

Received December 9, 2008 / Accepted March 18, 2009

Removal Efficiency in Water Treatment Process and Characteristic of Cell Sensitivity of Waterborne Enteric Viruses. Eun-Young Jung*, Hong-Gi Park, Dong-Jin Cha, Mi-Eun Jung and Pyung-Jong You. *Water Quality Institute, Water Works HQ of Busan Metropolitan City, Kyoungnam, 621-813, Korea* - Poliovirus, coxsackievirus, and ecovirus isolates from environmental sources were compared with laboratory strains to determine their removal rate in the water treatment process. The recovery efficiencies of poliovirus, coxsackievirus and echovirus using positive strains ranged from 72~108%. Regarding virus removal efficiency in water treatment of pilot-plants, about 99% of all of the viruses were removed in the sedimentation step and 100% of viruses were clearly removed through post-ozonation and BAC filteration. Using six cell lines tested viral sensitivity in cell line and showed different sensitivity as viruses. Polioviruses showed higher sensitivity in the BGMK cell line than other cells, and coxsackieviruses were detected in higher level in the BGMK and Vero cell lines. On the other hand, the RD cell line was useful in the isolation of ecoviruses.

Key words : Poliovirus, coxsackievirus, echovirus, BAC filteration

서 론

과거에는 수인성 질병을 일으키는 병원성 미생물은 콜레라(Cholera), 장티푸스(Typhid)등과 같은 질병을 유발하는 세균이 주로 알려져 있으나, 최근에는 바이러스(Virus)나 병원성 원생동물 등에 의해 발생되는 사례가 증가하고 있는 실정이다[3]. 이들 중 살아있는 숙주세포에서만 자기복제와 증식이 가능한 세포내 기생체인 바이러스는 일단 세포 밖으로 방출되면 새로운 숙주에 침투할 때까지 복제나 증식을 하지 못하며, 새로운 숙주를 찾지 못할 경우에는 다양한 환경적 요인에 의하여 불활성화 되어진다[5].

분변 오염등에 의해 수환경내 배출되어진 장관계 바이러스는 약 110여 종류가 알려져 있으며, 먹는 물의 수원에 분포할 경우 최소 감염 단위가 낮아 1~2 MPN (Most Probable Number)/100 l 정도의 소량으로도 감염되어 설사, 무균성 뇌수막염, 심근염 등의 급성질환을 일으킬 수 있다[2,4]. 이러한 장관계 바이러스는 정수장에서 소독이나 여과와 같은 정수처리공정에서 제거가 가능하지만, 세균에 비해 소독제에 대한 내성이 강한 특성을 가지고 있어 지표세균이 검출되지 않은 경우에도 바이러스가 검출될 가능성이 높다. 따라서, 처리수의 지표세균을 검사하여 처리능을 판정하지 않고 내성이 가장 강한 종류의 미생물을 처리할 수 있는 농도의 소독처리를 수행하도록 할 수 있도록 해야 한다[6,11].

정수처리공정은 거친 응집 · 침전 · 여과 · 소독의 완전정수처리에 의해 제어되는데 바이러스는 세균 등에 비하여 염소에 대한 저항성이 강하며, 완전정수처리를 거친 정수에서도 바이러스의 검출이 보고되고 있다[4,8]. 외국의 중소규모 정수장 혹은 간이 정수장에서 바이러스 오염으로 인하여 질병이 발생한 사례가 보고되고 있어 음용수에 의한 바이러스 감염사고에 대한 주의가 요구되고 있다[8].

그리고, 현재 환경 시료수에서 바이러스를 검출하기 위해 주로 사용하는 방법은 바이러스 표준시험방법에서 규정하고 있는 세포배양법이다[3,12]. 가장 전통적인 검출 방법인 세포배양법은 농축된 시료를 세포에 감염시켜 세포병변 증상을 관찰하는 것으로써 감염성 있는 바이러스의 유무를 확인할 수 있는 방법으로, 장관계 바이러스의 대부분은 영장류 및 인간의 신장세포를 이용하여 임상 및 환경시료로부터 분리가 가능하고, 이들 바이러스는 배양세포에 특이적인 세포병변효과(cytopathic effect)를 일으키므로 쉽게 확인이 가능하다. 이들 세포주중에서 정수처리기준에 의거한 표준시험방법에서는 BGM 세포주 사용을 제시하고 있다. 그러나 한가지 세포주만을 사용하였을 때 과연 시료 중의 장바이러스들을 어느 정도 검출할 수 있는지에 대한 연구는 부족한 실정이다[7].

따라서 본 연구는 부산시 정수장에서 운영하고 있는 고도정수처리공정을 축소한 pilot-plant를 이용하여 생물활성탄 및 오존처리공정의 효율성을 수질 변화 조사를 통해 평가하고, 부산시 상수원수에서 가장 많이 검출되는 장바이러스 3종을 대상으로 정수처리 공정별로 각 바이러스종의 제거효율을 조사하였다. 또한, 표준시험방법에서 제시한 BGM 세포주 외의 다른 세포주에서 각 바이러스들의 감염효율을 조사함으로써 BGM 세포주 사용의 적정성을 평가하고자 하였다.

***Corresponding author**
Tel : +82-51-669-4641, Fax : +82-51-669-4609
E-mail : meetjung@korea.kr

재료 및 방법

정수공정별 수질조사 항목 및 방법

정수공정별에 따른 수질조사는 6단계 즉 원수, 전오존 처리조, 침전조, 여과 수조, 후오존 처리조, BAC 여과수(석탄계 여과수)시료를 대상으로 실시하였다. 생물활성탄 공정에 따른 수질조사 항목의 이화학적 분석은 Standard method [1]에 따랐다. 미생물 항목인 총대장균군(Total coliforms) 및 대장균(*E.coli*) 실험은 막여과법을 이용하여 실시하였으며, 종속영양세균(HPC)은 R2A agar (Difco사) 평판배지에 시료 1 ml를 도말한 후 25°C 배양기에서 7일간 배양하여 형성된 colony를 계수하였다[1].

바이러스 회수율 조사

바이러스 회수율은 음성시료와 양성시료 각각 1개를 이용하여 3회 실시하였다. 먼저 양성시료는 멸균된 폴리프로필렌 용기에 3차 증류수 40 l를 넣고 약 200 PFU/ml 농도의 약독화 폴리오바이러스 정도관리용 저장용액 1 ml를 첨가하였다. 혼합시킨 시료는 펌프를 이용하여 1-MDS filter (Cuno사)가 들어 있는 표준필터장치로 통과시켜 여과하였다. 또한, 음성시료도 3차 증류수 40 l를 멸균된 폴리프로필렌 용기에 넣어 양성시료 실험과 동일하게 통과시켰다. 여과시킨 1-MDS filter를 총 배양성 바이러스 분석법에 따라 농축하여 3~4일 전에 배양된 BGM (Buffalo Green Monkey kidney) 세포에 각각 감염시켜 세포병변현상(Cytopathic effect: CPE) 여부를 관찰한 후 MPN program (ICR-MPNV Software Program)을 이용하여 수치를 산출하였다.

세포배양

바이러스 배양에는 국립환경연구원에서 분양받은 BGM 세포주와 한국세포주은행으로부터 분양받은 VERO 세포주, Hep-2 세포주, Hela 세포주, HepG2 세포주, MDCK 세포주를 사용하였다. 세포의 계대는 먼저 monolayer가 형성된 세포주를 배양기에서 꺼내어 배양용기 안에 있는 배지를 제거한 후 trypsin-EDTA를 세포배양용기에 적정량(약 10 ml)을 넣고 36.5±1°C 배양기에 5분 정도 방치하였다. 세포들이 배양용기의 바닥에서 완전히 떨어지는 것을 확인한 후 떨어진 세포들을 1,000× *g*, 10분간 실온에서 원심 분리한 후에 상층액을 깨끗이 제거하고 침전된 세포를 새로운 증식용 배양액에 혼합한 후 세포배양 플라스크(25 cm^2)에 분주하여 36.5°C, 5% CO_2의 배양기에서 배양하였다.

Pilot-plant 장치

본 연구에 사용된 Pilot-plant 실험장치는 기존 급속 여과시스템에서 전 염소처리 공정이 생략되었고, 오존의 전·후 처리와 BAC 공정을 부가한 시스템으로 실험하였으며(Fig. 1), BAC 운영조건은 Table 1과 같다. 원수는 낙동강 하류지점인 매리 취수장의 표층수를 사용하였고, 응집제로는 Polyaluminum Sulfate Organic Magnesium (PSOM)을 사용하였다. 또한 본 실험장치의 입상활성탄의 재질은 석탄계(F-400, Calgon사) 재생탄이며 여과층의 깊이는 2.5 m이다.

정수공정별 바이러스 제거율 조사

실험은 3차 증류수 30l에 2.5×10^8 PFU의 에코바이러스, 3.5×10^7 PFU의 콕사키바이러스, 3×10^7 PFU의 폴리오바이러스를 각각 첨가시켜 혼합한 후, 정량펌프를 이용하여 3 ml/min의 속도로 원수 유입조에 주입하였다. 시료 채수는 미국 EPA의 ICR 및 환경부에서 권장하는 표준필터장치를 조합하여 사용하였으며, 시료 채수는 1-MDS filter를 이용하여 원수·전오존은 200~300 l를 침전·여과·후오존·BAC 여과 그리고 정수는 1,600 l 이상을 여과하였다. 채수한 시료의 전처리는 미국 EPA의 ICR 방법 및 환경부에서 정한 표준시험방법에 준하여 수행하였다[3]. 멸균 튜브가 장착된 연동펌프(peristaltic pump)를 사용하여 50 mM glycine이 함유된 1.5% Beef extract 완충액(pH 9.5)을 여과지가 장착된 Housing filter내로 밀어 넣어 1분간 정체시킨 후 3회 반복하여 용출시켰다. 먼저 탈리된 용출액의 pH를 7.0~7.5로 조정하고 1 M HCl로 3.5±0.1로 조절한 후 실온에서 30분간 교반시켜 침전물의 생성

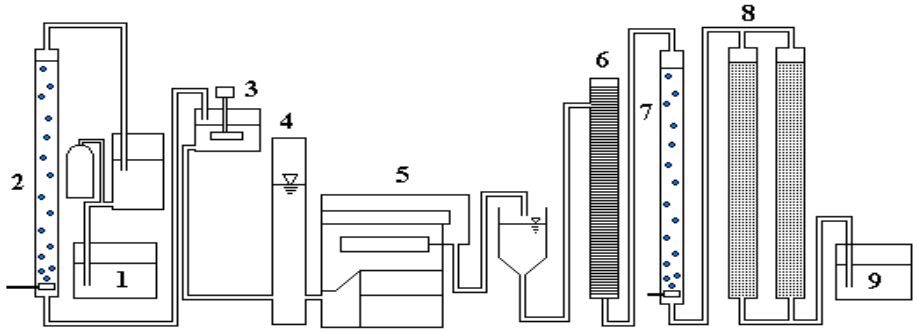

Fig. 1. Schematic diagram of a pilot-plant for water treatment. 1; raw water distributed tank, 2; O_3 pre-contactor, 3; coagulant mixer, 4; circulator tank, 5; pulsator, 6; settling tank, 7; O_3 post-contactor, 8; BAC column, 9; clean water tank.

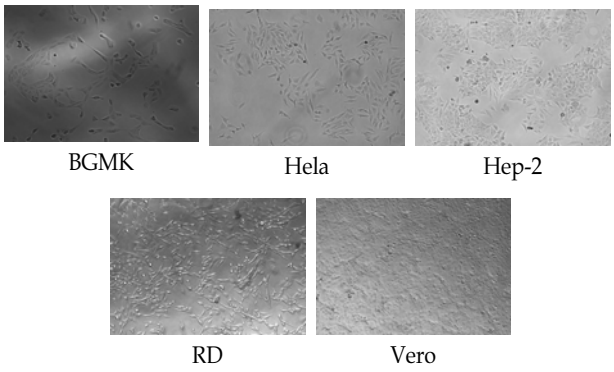

Fig. 2. Morphology of each cell lines in this study.

유무를 확인하였다. 탈리액을 2,500× *g*, 4°C에서 15분간 원심분리하고 상등액을 제거한 후 0.15 M PBS (Phosphate Bufferd Saline, pH 9.4) 30 ml를 첨가한 후 완전히 용해시켰다. 용해된 침전물을 7,000× *g*로 4°C에서 10분간 원심분리 한 후, 상등액만 취하여 1 M HCl로 pH 7.0~7.5로 조정하였다. 미생물 오염을 제거하기 위해 구경 0.22 μm 멸균 필터를 이용하여 상등액을 여과하였다. 여과시킨 상등액을 3~6일간 배양된 세포배양 플라스크(25 cm^2)의 BGM (Buffalo green monkey kidney) 세포주, VERO (African green monkey kidney, adult)세포주, Hep-2 (Human larynx epidermoid) 세포주, Hela (Human cervix epitheroid carcinoma) 세포주, MDCK (Bovine kidney) 세포주, RD (Human embryonal rhabdomyosarcoma) 세포주에 각각의 시료를 접종하였다 (Fig. 2). 음성대조구 및 양성대조구는 각각 0.15 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 7.4) 용액과 순화된 3종의 바이러스를 0.15 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 용액으로 희석하여 시료 접종량과 동일하게 접종하였다. 배양기에서 각세포주에 시료를 흡착시켜 15분 간격으로 배양용기를 좌우로 가볍게 기울여 접종된 시료가 골고루 세포에 흡착되도록 하였다. 접종 80~120분 후 세포 배양플라스크에 2% Fetal Bovine Serum (FBS)가 함유된 각 세포주의 배지를 분주한 후 14일간 배양하며 세포병변현상을 관찰하였다. 원수·전오존수는 100 l, 침전수는 300 l, 여과수·후오존수·BAC 처리수 그리고 정수는 1,000 l를 기준으로 환산하였으며 3회 반복 실험하였다.

Table 1. Operating condition of water treatment process using biological activated carbon (BAC)

Parameter	Operating condition
Empty Bed Contact Time (min)	12
Linear Velocity (m/hr)	10
Bed depth (m)	2.5
Backwashing time (min)	19
Expansion rate (%)	40
Pre-Ozone dose (mg/l)	1
Post-Ozone dose (mg/l)	2

결과 및 고찰

정수처리 공정별 수질변화

원수가 전오존 처리조에서 침전조·여과조를 거쳐 후오존 처리 공정 단계에 이르면, 이미 탁도·$KMnO_4$ 소비량·금속성 양이온 함량 등은 각각 원수에 비해 97.4%, 73.1%, 71.8%의 제거효율을 보였으며 pH, NH^+_4-N 등은 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 마지막 단계인 BAC 유출수는 후 오존처리 단계에서까지 제거되지 않았던 NH^+_4-N 등을 포함한 모든 항목들이 거의 제거됨을 알 수 있었다. 따라서 수질분석결과 BAC 여과 단계에 이르면 유입되는 유기물질을 적절하게 흡착과 생분해에 의하여 제거하는 것으로 나타났다. 그러나 이들의 수질조사 항목별 분석치의 절대값은 원수의 상황에 따라 차이가 날 수 있으며, 낙동강 원수의 경우 식물플랑크톤에 의한 부영양화 즉 하계의 *Microcystis aeruginosa,* 동계의 *Stephanodiscus hantzschii* 등에 의한 대량 증식으로 pH, NH^+_4-N, BOD 등의 농도가 계절에 따라 다르게 나타나는 것으로 보고된 바 있다[10]. 본 연구의 조사기간 중에는 조류 농도의 감소 등으로 인하여 예년에 비해 원수의 수질은 전반적으로 양호한 것으로 나타났다.

바이러스 정량 및 회수율

3종의 바이러스 정량은 양성 바이러스주를 대상으로 Plaque assay법을 이용하였으며, 정량한 결과 ml당 2.5×10^8 PFU의 에코바이러스, 3.5×10^7 PFU의 콕사키바이러스 그리고 3×10^7 PFU의 폴리오바이러스를 얻을 수 있었다.

바이러스 회수율은 1-MDS catridge filter로 여과시켜 유기응집법을 이용하여 농축시켰다. 농축시킨 양성 시료는 원액, 1:5, 1:25 희석배율로, 음성 농축액($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7.4)은 원액 농도로 각각 BGM 세포에 1 ml씩 접종한 후 14일간 배양하여 CPE 여부로 확인하였다. MPN program으로 산출한 결과 1850~2230 MPN/100 l로 나타났으며, 회수율은 72~108%를 보여 표준시험방법에서 규정한 회수율 35~150% 기준을 만족하는 것으로 나타났다.

정수처리 공정별 바이러스 제거율

정수처리공정에 따른 바이러스 제거효율은 맥동식 Pilot-plant를 이용하여 3회 실시하였다. 원수 분배 탱크조에 연속적으로 바이러스를 주입시키면서, 정수처리 공정별로 시료를 채취하였다. 원수 분배 탱크조를 통과한 시료는 전오존 접촉조·침전·여과·후오존 접촉조·BAC 여과를 거쳤으며, 각 공정별로 500~1,500 l의 시료를 여과, 농축하여 표준시험방법에 의거한 세포배양법으로 실험하였다. 200 l의 원수에서 정량된 바이러스를 기준으로 하였을 때 전 오존 접촉에서는 96.8%의 바이러스가 제거되었는데 이때 Pilot-plant의 전오존 투입비는 1 mg/l였다.

일반적으로 원수중의 탁질 성분은 침전단계에서 90% 이상 제거 되어지고, 여과단계를 거치면서 거의 모든 탁질은 제거된다. 바이러스의 경우는 일반적인 탁질과는 달리 여과 및 소독 과정이 병행 되어야만 완전한 제거가 가능하다. 본 연구 결과에 따르면 바이러스의 경우 전오존을 거친 침전단계에서는 평균 99.0%, 여과에서는 99.5%가 제거되었으며, 후오존을 거친 BAC 여과수 시료에서는 100% 제거되어짐을 확인할 수 있었다(Table 2). 세 종류의 바이러스 중에서 에코바이러스의 경우 폴리오바이러스와 콕사키바이러스에 비해 제거율이 약간 떨어지는 것으로 나타났다. 지표세균인 총대장균군의 경우 원수에서는 평균 340 MPN/100 ml 검출되었으나 후오존을 거친 BAC 여과수 부터 검출되지 않았고, 대장균의 경우에는 전오존 단계 이후부터 검출되지 않아 바이러스와 비슷한 제거 경향을 보였다. 따라서 오존이 주입되는 전·후오존 과정이 정수처리과정에서 바이러스 및 미생물 농도를 감소시키는데 있어서 가장 효율적인 단계임을 알 수 있었다. 그리고 이러한 바이러스 제거율은 규모가 비슷한 Pilot-plant를 사용하여 조사한 Robeck의 침전단계에서 98%, 여과단계에서 99.84% 제거율과 거의 비슷한 결과를 보였는데[11], 적절한 정수처리공정을 유지하여 BAC 여과를 거치면 대부분의 바이러스는 정수처리과정에서 거의 100% 제거될 수 있음을 확인할 수 있었다.

Table 2. Analyses of virus elimination ratio after performed each step of water treatment process

Step	% of Virus remained		
	Poliovirus	Coxsackievirus	Ecovirus
Raw water	100	100	100
Pre-ozone	3.22	4.58	10.3
Sedimentation	0.66	1.20	5.30
Sand filter	0.40	0.32	1.50
Post-ozone	0	0	0
BAC	0	0	0
Finished water	0	0	0

Table 3. Comparative sensitivity of seven cell line to various viruses

Cell line	Virus titer (PFU/ml, 10^7)*		
	Polivirus	Coxsackievirus	Ecovirus
BGMK	223	211	170
Hela	210	172	172
Hep-2	193	180	162
MDCK	180	169	180
RD	172	172	242
Vero	190	208	169

*tested in same condition of three times

실제로 2년 동안의 바이러스 분포조사에서도 부산시 3개 정수장의 고도정수처리공정을 거친 정수와 수도꼭지에서는 바이러스가 검출되지 않았기 때문에 부산시 정수장의 바이러스 제거능은 충분히 확보한 것으로 판단된다[9]. 그리고 전오존 처리에서 97% 이상의 바이러스가 제거되어질 수 있음을 확인하였으므로, 오존과 같은 소독제에 대해 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 보여진다.

세포주별 바이러스 감염능 평가

본 연구에서 사용된 폴리오바이러스, 콕사키바이러스, 에코바이러스를 6개의 세포주를 대상으로 하여 세포병변현상을 관찰하여 감수성 조사를 실시하였다(Table 3). 폴리오바이러스의 경우 BGMK, Hela, Hep-2 세포주 순으로 바이러스에 대한 감수성이 높게 나타났으며, 콕사키바이러스의 경우 원숭이 신장세포인 BGMK 와 Vero 세포주에서 높은 감수성을 나타내었다. 에코바이러스의 경우에는 현재 사용 중인 BGMK 세포주에 비해 RD 세포주에서 30% 정도 높은 감수성을 나타낸 것으로 보아 현재 표준시험방법에 사용 중인 BGMK 세포주만을 사용했을 경우 바이러스종류에 따라 검출률이 현저히 낮아질 수 있음을 알 수 있었다. 3종의 바이러스가 정수처리공정을 거치고 난 후에도 세포주에 따라 검출률에 차이가 나는 것을 알 수 있었다(Table 4). 따라서, 환경중에 존재하는 다양한 바이러스를 검출 및 검출률을 높일 수 있는 다양한 세포주 및 시험방법의 개발이 시급한 것으로 판단된다.

Table 4. Comparative sensitivity of cell lines by viruses after performed each step of water treatment process of water treatment process

Step	% of Virus remained											
	Hep-2			Hela			RD			Vero		
	Pol	Cox	Eco	Pol	Cox	Eco	Pol	Cox	Eco	Pol	Cox	Eco
Raw water	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Pre-ozone	8.2	7.7	8.2	8.7	8.0	3.4	4.0	3.8	13.8	5.6	6.2	4.8
Sedimentation	2.3	2.1	3.2	3.1	3.0	2.8	0.2	1.1	6.1	1.3	0.8	1.9
Sand filter	0.8	0.9	1.3	1.0	0.8	1.0	0.1	0.4	2.4	0.4	0	0.2
Post-ozone	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Pol.: poliovirus, Cos.: coxsackievirus, Eco.: ecovirus

요 약

환경시료에서 많이 분리되는 장내바이러스 중 폴리오바이러스, 콕사키바이러스, 에코바이러스를 이용하여 정수처리 공정별 제거율을 조사하였다. 양성 시료로 사용된 바이러스들의 회수율은 72-108%의 범위로 나타났다. 이들 3종 바이러스들을 대상으로 정수처리공정별 제거효율을 조사한 결과 약 99%의 바이러스가 침전단계에서 제거되어졌고, 후오존과 BAC 여과과정을 거치면서 100% 제거되어짐을 확인할 수 있었다. 6개의 세포주를 사용하여 바이러스별 감수성을 조사한 결과 폴리오바이러스는 BGMK 세포주, 콕사키바이러스는 Vero 및 BGMK 세포주가 다른 세포주에 비해 높은 감수성을 나타내었고, 반면 에코바이러스는 RD 세포주에서 가장 분리가 용이하였다.

References

1. APHA. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th eds, APHA-AWWA-WPCF, New York.
2. Cho, Y. H. and C. H. Lee. 2002. Detection of Poliovirus in Water by Cell Culture and PCR Methods. *Kor. J. Microbiol.* **38,** 198-204.
3. EPA. 1991. Guidance Manual for Compliance with the Filteration and Disinfection Re quirements for Public Water Systems Using Surface Water Sources.
4. Grabow, W. O. K., P. Coubrough, C. Hilner, and B. W. Bateman. 1984. Inactivation of Hepatitis A Virus, Other Enteric Viruses and Indicator Organism in Water by Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **46,** 619-624.
5. Jung, Y. S. 2000. National survey research and significance from ICR method. *Forum collection of waterborne viral analysis.* 21-39.
6. Jung, H. M. and J. Y. Yoon. 1994. The Opinion with Microbiological Standard of American Drinking Water. *J. KSWQ.* **10,** 62-71.
7. Tani, N., K. Shimamoto, K. Ichimura, Y. Nishii, S. Tomita, and Y. Oda. 1992. Enteric Virus Levels in River Water. *Wat. Res.* **26**, 45-48.
8. Park, J. Y. 1994. Drinking Water Microbiology. pp. 385-396, Chemical Engineering Research Corporation, Seoul.
9. Park, H. K., E. Y. Jung, Y. J. Lee, J. M. Jung, D. H. Choi, H. J. Son, K. W. Kwon, and Y. K. Hong. 2003. Distribution of Waterborne Enteric Viruses in Raw Water and Tap Water in Busan Metropolitan City. *J. Life Science*. **13,** 197-205.
10. Park, H. K., C. M. Chung, J. R. Bahk, and Y. K. Hong. 1999. The Relationship between Phytoplankton Productivity and Water Quality in Downstream of Nakdong River. *J. of the Korean Environmental Sciences Society.* **8,** 101-106.
11. Robeck, G., N. A Clarke, and K. A. Dostal. 1962. Effectiveness of water reatment processes for virus removal. *Journal American waterworks*. **54,** 1275-1290.
12. Shin, G. A. and S. Mark D. 2003. Reduction of Norwalk Virus, Poliovirus 1, and Bacteriophage MS2 by Ozone Disinfection of Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3975-3978.