공학박사 학위논문

낙동강 하류 수계에 존재하는 유해생물 남조류와 바이러스의 분리 및 제거방법

이 논문을 [illegible] 제출함

2004년 2월

부경대학교 대학원

생 물 공 학 과

박 홍 기

박홍기의 공학박사 학위논문을 인준함

2003년 12월 26일

주 심	공 학 박 사	공 인 수	인
부 심	농 학 박 사	박 중 연	인
위 원	공 학 박 사	김 중 균	인
위 원	공 학 박 사	김 성 구	인
위 원	이학/농학박사	홍 용 기	인

목 차

그림 목차 (List of Figures) v
표 목차 (List of Tables) vii
영문 초록 (Abstract) 1

서론 5

제 1 장 낙동강 하류 수계에 존재하는 *Microcystis aeruginosa*의 무균 분리 및 16S rRNA 유전자 염기서열분석 14
Abstract 14
서론 15
재료 및 방법 17
1-1. 조사지점 17
1-2. 이화학 및 생물학적 조사 17
1-3. *M. aeruginosa*의 무균분리 및 16S rRNA gene sequence ... 18
1-4. DNA 추출 및 정제 20
1-5. PCR 증폭 21
1-6. 염기서열 분석 21
1-7. 균주보관 22
결과 및 고찰 22
1-1. 시료수의 수질 22
1-2. *M. aeruginosa*의 무균분리 23

1-3. PCR 증폭 26
1-4. 염기서열 분석 26

제 2 장 응집제 Ceramic-Zeolite type과 황토를 이용한 *Microcystis aeruginosa* 제거에 관한 연구 41
Abstract 41
서론 42
재료 및 방법 45
2-1. 공시조류 45
2-2. 배지조성 및 배양 45
2-3. 응집제에 의한 *M. aeruginosa* 제거 46
결과 및 고찰 47
2-1. 수질변화 47
2-2. 무균분리 *M. aeruginosa*의 응집제에 의한 제거 효과 47
2-3. 현장채취 *M. aeruginosa*의 응집제에 의한 제거 효과 49

제 3 장 낙동강 하류 상수원수와 수돗물에서의 수인성 장관계 바이러스 분포조사 57
Abstract 57
서론 58
재료 및 방법 61
3-1. 조사기간 61
3-2. 이화학 및 미생물학적 조사 61
3-3. 바이러스 및 세포주 62
3-4. 시료채수 및 여과 63

3-5. 탈리 및 유기응집농축 63
3-6. 세포배양 및 정량 64
3-7. 바이러스 정량 65
3-8. 면역형광분석 65

결과 및 고찰 67
3-1. 물리·화학적 수질특성 67
3-2. 미생물학적 수질특성 68
3-3. 바이러스 검출 및 분포특성 69
3-4. 바이러스 동정 71

제 4 장 낙동강 하류 상수원수의 생물활성탄 정수처리공정 및 오존에 의한 수질변화와 폴리오바이러스 제거 83
Abstract 83
서론 85
재료 및 방법 90
4-1. Pilot-plant 장치 90
4-2. 오존처리장치 90
4-3. 정수공정별 수질조사 및 기간 91
4-4. 정수공정별 수질조사 항목 및 방법 91
4-5. 세균 생체량 측정 92
4-6. 세균 생산력 측정 92
4-7. 세균 동정 93
4-8. 주사전자현미경 관찰 94
4-9. 바이러스 stock 준비 94

4-10. 바이러스 정량 95
4-11. 바이러스 회수율 조사 95
4-12. 정수공정별 바이러스 제거율 조사 96
4-13. 오존농도별 바이러스 제거율 조사 98
4-14. 세포배양 99
4-15. ICC-PCR 99

결과 및 고찰 101
4-1. 정수처리 공정별 수질변화 101
4-2. 생물활성탄의 미생물학적 특성 102
4-3. 바이러스 정량 및 회수율 103
4-4. 정수처리 공정별 바이러스 제거율 104
4-5. 오존처리에 따른 바이러스 제거율 106

국문초록 126
참고문헌 129

그림 목차 (List of Figures)

Fig. 1-1. Typical colony of *Microcystis aeruginosa* isolated at the Mulgum station from the Nakdong river (×200) 27

Fig. 1-2. PCR amplification of the 16S rRNA region of *Microcystis* from an environmental bloom. *Microcystis* bloom samples collected in Nakdong River 28

Fig. 1-3. 16S rRNA sequence of *Microcystis aeruginosa* from Nakdong River aligned with that of *M. aeroginosa* (AF139292) 29

Fig. 1-4. Phylogenetic dendrogram of isolated strains (sample 1, 2 and 3) and 5 species of *Microcystis* in downstream of Nakdong River derived from 16S rRNA sequence 33

Fig. 2-1. Effect of Ceramic-Zeolite (1.5 ㎎/ ℓ) and Yellow loess (10 ㎎/ ℓ) on the removal of the axenic cultured *M. aeruginosa*. Ceramic-Zeolite (1.5 ㎎/ ℓ) and Yellow loess (10 ㎎/ ℓ) were added to 200㎖ of cell culture. Values are expressed as average from four measurement during March, 1998 51

Fig. 2-2. Effect of Ceramic-Zeolite (1.5 ㎎/ ℓ) and Yellow loess (10 ㎎/ ℓ) on the removal of the field-collected *M. aeruginosa* were added to 200㎖ of water sample. Values are expressed as average from three measurements during July, 1999 53

Fig. 3-1. Sampling sites for surveying of viruses in Nakdong

river 73
Fig. 3-2. Cytopathic effect in BGM cells 74
Fig. 3-3. Enteric viruses distribution of seasonal and sampling station in raw water 75
Fig. 3-4. Identification of enteric virus in raw water by immuno fluorescent test 76
Fig. 4-1. Schematic diagram of a pilot-plant for water treatment 110
Fig. 4-2. Schematic diagram of oxidation process 111
Fig. 4-3. Plaque Assay for poliovirus titeration, Photograph was taken under microscope (×300) after staining with crystal violet 112
Fig. 4-4. Schematic diagram of PCR-targetted gene fragment position in genome of poliovirus 113
Fig. 4-5. Scanning electron micrograph of bacteria attached on particles of BAC. The carbon particles were taken from upper part 114
Fig. 4-6. Schematic view of virus detection from water samples 115
Fig. 4-7. Detection of poliovirus by ICC-PCR 116

표 목차 (List of Tables)

Table 1-1. Water quality at the Mulgum station from the Nakdong River. Values are expressed as average from four measur ements during September to October, 1997 34

Table 1-2. Effect of pretreatment for cell dissociation. The result was expressed as colony formation unit 35

Table 1-3. Resistance of *M. aeruginosa* to several antibiotics. The res istant concentration was determined from the dose-response curve against antibiotic concentrations 36

Table 1-4. Amount of chlorophyll-a ($\mu g/\ell$) from the *M. aeruginosa* cells grown on solid media prepared with different gelling agents 37

Table 1-5. Primer pairs used for the detection of cyanobacteria 38

Table 1-6. The morphological comparisons of 6 species of *Microcys tis* in the Nakdong River 39

Table 1-7. Genetic distance of isolated strains (sample 1, 2 and 3) and 5 species of *Microcystis* in downstream of Nakdong River derived from 16S rRNA sequence. 40

Table 2-1. Relative content (%) of elements in the coagulant Ceramic -Zeolite types 55

Table 2-2. Specification of Ceramic-Zeolite types 56

Table 3-1. Clinical syndromes associated infection by enteric viruses 77
Table 3-2. Water quality in raw water from July 2001 to December 2001 78
Table 3-3. Water quality in water treatment plants from January 2002 to November 2002 80
Table 3-4. Identification of enteric viruses in raw water from July 2001 to November 2002 82
Table 4-1. Operating conditions of water treatment process using biological activated carbons 117
Table 4-2. Specification of granular activated carbons(coal-based) 118
Table 4-3. Analytical method and instrument 119
Table 4-4. Primer pairs used for detection of poliovirus 120
Table 4-5. Water quality from each step of water treatment process using biological activated carbons 121
Table 4-6. Seasonal distribution of bacteria in coal-based BAC 122
Table 4-7. Elimination of virus after each step of water treatment process 123
Table 4-8. Survival rate of virus contact with initial concentration of ozone 124
Table 4-9. Comparison of Cell culture(CPE) and ICC-PCR to detect poliovirus inactivation by ozone 125

Isolation and Removal Techniques of Harmful Organisms Cyanobacteria and Virus from Downstream of Nakdong River

Hong Ki Park

Department of Biotechnology and Bioengineering, Graduate school,

Pukyong National University

Busan 608-737, Korea

Abstract

The purpose of this paper is to systematically survey isolation and seasonal characteristics of blue green algaes and viruses of the chief harmful organisms in downstream of Nakdong river. And effective removal method of harmful organism is to found by this.

For axenic isolation of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa,*

water bloom at the Mulgum station from the Nakdong River was pretreated by shaking with distilled water. Removal of bacteria was accomplished using antibiotics (150 ㎍/㎖ ampicillin and 25 ㎍/㎖ neomycin) and colonizing on CB solid medium prepared from 0.7% agarose at 30℃ under 40 μmol m^{-2} s^{-1} light. Among 26 strains of the *Microcystis* species, only three strains were axenically established. The three strains were examined by PCR-amplified 16S rRNA gene and 16S rRNA sequencing. The similarities were 99.5 ~ 100% with *M. aeruginosa* AF 139292.

For the proposal of *Microcystis aeruginosa* control technique by coagulants, removal effects of coagulants were carried out using isolated strain and collected water bloom of *M. aeruginosa* on Downstream of the Nakdong River. Both of purified and field-collected *M. aeruginosa* were entirely sedimented by the addition of the coagulant Ceramic-Zeolite type Co 100 (1.5 ㎎/L) within 24hr, but Yellow loess (10 ㎎/L) was less effective for the removal of *M. aeruginosa* within 24hr. Thus it was concluded that Ceramic-Zeolite type Co 100 was the most effective coagulant.

We detected waterborne enteric viruses from the raw water and tap water in Busan metropolitan city by the total culturable virus assay of EPA standard method. According to the results of

survey from July 2001 to November 2002, thirteen out of twenty one in raw water samples were positive (61.9%) for enteric viruses and all of the treated water and tap water samples were negative. The enteric viruses in raw water were mainly distributed through the summer to the early winter, suggesting the seasonal characteristics of virus distribution in water. The titer of enteric viruses per 100 liters of the raw water was ranged from 1.92 to 9.70 MPN by TCVA-MPN program. The isolated viruses were identified as either human poliovirus type I or enteroviruses by the immunofluorescent assay.

Water quality and removal of poliovirus have been determined in a pilot plant using biological activated carbon (BAC) during water treatment process at the downstream of the Nakdong River. Most of water quality parameters were highly improved after passing through BAC. Predominant bacterial species grown in BAC were identified as *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* and *Aeromonas* species. For the removal efficiency of the poliovirus type III, 99.6% of virus was removed by pre-ozonation, sedimentation and sand filteration 100% of virus was after in BAC filteration step. In the survey of virus removal efficiency by ozone, approximately 61.1% of poliovirus was

inactivated by ozone of 0.4 ㎎/L within 5 min, and 100% of poliovirus was inactivated by ozone of 0.8 ㎎/L over 10 min.

The important issue in water supply is how to minimize disinfection byproducts of the same time to remove pathogenic micro-organism of cyanobacteria and viruses. It will go forward satisfying risk decrease of disinfection byproducts and microorganisms removal from escaping the existing monotonous water quality management.

서 론

낙동강은 강원도 태백의 황지에서 발원하여 경북 봉화~하구둑까지 총연장 521.5km에 달하는 대하천이며, 유역면적은 23,817.3km^{2}으로 동서 길이는 약 180km, 남북 길이는 약 120km로 남한에서 가장 큰 유로 연장을 가지고 있다[1]. 그러나 낙동강은 우리나라의 4대강과는 틀리게 연평균 강우량이 한강, 금강, 영산강 등의 전국평균인 1,274mm보다 다소 적은 1,224.4mm로 전국평균 강우량의 96%수준이며, 수자원 부존량도 낙동강 권역계 기준 연간 약 375억톤이며, 이중 증발과 지하 침투량 등 손실량이 184억톤, 유출되는 수량은 약 191 억톤으로 유출율 또한 전국 최저수준인 50.9%에 불과하다[1,2]. 여기서 여름철 홍수시의 유출량 105억톤을 빼고 나면 평상시 낙동강 수자원 부존량은 86억톤 (수자원 총량의 22.9%)에 불과하다. 이러한 수치는 전국 평균 총 이용율의 24%에도 못 미치고 있다. 낙동강 수계에는 경북, 대구, 경남, 부산 등 8개 광역시·도와 54개 시·군·구가 위치하고 있고 6,682천명 (1998년 기준)의 인구가 밀집되어 있으며, 부산시뿐만 아니라 이 4개 시도의 상수원으로 90% 이상을 낙동강에서 취수하고 있는 실정이다. 따라서 각 시도에서 관할하고 있는 취수장 및 수자원공사의 취수장 등 공식적으로 집계된 취수장만 하더라도 총 135개의 취수장이 있다[1,3]. 이렇게 농·공업 용수원 및

식수원으로서의 역할이 매우 큰 낙동강은 지난 20~30여 년간 수자원의 수요 급증 및 공업화 등으로 인하여 강 유역 전체가 물리·화학적으로 상당히 변화하고 있다. 특히, 낙동강 수계의 하류지역은 1987년 하구언 축조이후 유속저하, 외부로부터 유입되는 각종 오·폐수로 인하여 조류가 대발생 하는 등 과영양 (hypertrophy) 상태를 나타내고 있다. 특히 중류에 위치한 금호강에서 높은 농도의 영양염이 유입되어 고농도의 무기질소가 및 인이 유입되어 고농도의 무기질소 및 인이 유입되어 무기질소·인의 농도가 갑자기 증가하는 등 상류지역의 지속적인 오염과 부하 등으로 인해 자정 능력을 상실하여 수질오염이 날로 심화되고 있는 실정이다[4]. 대표적인 사례가 1991년 페놀사건, 1994년 디클로메탄 사건, 1996년 녹조 발생, 1997년 바이러스 검출문제 등으로 신문이나 TV 등의 보도매체에서 가시화 되어 사회적인 이슈로 대두하게 되었다. 최근 들어 낙동강 수계 하류지역에서 문제시되는 것은 남조류, 원생동물 및 바이러스 등의 유해생물과 환경 호르몬, 농약류 등의 유해물질인데 현재 가장 현안이 되는 대표적인 유해생물은 남조류와 바이러스이다.

먼저 남조류 (Cyanobacteria)는 영양염류인 질소 (주로 분뇨, 생활하수·축산폐수)와 인 (세제)성분이 많을 때 호소나 정체된 하천에서 발생되며 부영양 단계에서도 대량 발생된다. 또한 수중에서 부유생활을 하고 비교적 단순한 체계와 현미경적 크기를 가지며, 엽록소 (Chlorophyll)라는 색소를 가지고 있어 이것에 의해 광합성을 하는

하등 식물군으로 해수보다 담수에 매우 풍부하게 서식한다[5]. 상수원수 중의 남조류는 원수의 pH 변화와 색도 및 탁도를 유발시키며 배관의 부식을 초래한다. 또한 정수과정 중에서는 여과지 폐색, 응집, 침전의 방해 등의 문제를 유발하며, 남조류 세포의 대사물질 및 사멸, 분해에 의해 나오는 용해성 휴믹 물질은 THM 발생의 전구물질이 된다. 이러한 남조류 중에서 가장 문제시 되는 것은 *Microcystis*이다. 현재 낙동강 수계에서 동정된 *Microcystis*는 모두 6종류인데 담수 생태계에서 장기간 수화 (water-bloom) 현상을 일으키고 있다[6]. *Microcystis*가 낙동강에 본격적으로 번무 하기 시작한 것은 지난 1992년으로, 7월말에 폭발적으로 대발생한 이후 해마다 하절기에 대량으로 나타나며, *Microcystis*의 우점도가 95% 이상에 이르고 있으며 5월말부터 10월말까지 만성적으로 출현하고 있다[7]. 이러한 현상이 매년 발생할 우려가 높기 때문에 현재 환경부에서는 조류 경보제를 도입하여 대청호에는 이미 시행중에 있으며 낙동강은 시범적으로 실시하고 있는 중이다. 남조류는 광합성 독립영양체인 그램 음성균으로 남조류의 발생은 수원의 부영양상태를 나타내는 지표이며 수자원으로서의 가치를 하락시키므로 'nuisance algae'라고 불리어졌으며, 생리생태학적 연구의 대상이 되었다[8]. 남조류는 미관상 좋지않을 뿐 아니라 신진대사물질로 Geosmin이나 2-MIB와 같은 불쾌한 맛과 냄새를 유발하는 물질을 발생시킬 뿐만 아니라 간장독소인 Microcystin과 같은 독성물질을 생성, 용출시켜 수질을 크게 악화시

키기 때문에 안전한 수돗물의 공급을 위해서 반드시 제거해야 하는 수질 오염물질이다. 남조류는 세포내에 기포를 가지고 있어 비중이 물 보다 작은 경우가 많으므로 수면에 떠올라 scum을 형성하며 바람에 의해 물가로 밀려온 이 scum을 가축이나 야생동물이 마시고 죽는 사례가 외국의 연구결과에 보고되고 있는 실정이다[8,9]. 우리나라에서는 아직 남조류 독성물질에 의한 동물이나 인간의 피해가 아직 보고되고 있지는 않지만 독성물질을 생산하는 남조류가 상수원으로 이용되는 수역에서 녹조현상을 일으키는 것이 밝혀짐에 따라, 잠재적인 위해성을 방지하기 위하여 독성물질 생산 남조류의 제거 및 그 생산 독성물질이 미량이라도 잔류되지 않도록 정수처리 과정에서의 완벽한 제거가 매우 중요한 문제로 대두되고 있다. Microcystin은 세포내 독성 물질이므로 세포가 파괴되지 않는 동안에는 세포내에 존재하며 외부의 수체로 유출되지 않는다. 그러나, 세포가 노화되어 자기분해가 일어나거나 또는 황산구리 등의 살조제 처리를 하거나 정수처리과정에서 전염소 처리를 할 때는 조체 파쇄에 따른 Microcystin의 용출 및 THM의 생성 촉진 등 2차적인 문제를 일으킬 수 있다[10]. 따라서 이러한 문제를 피할 수 있는 근본적인 제거방법이 요구되어진다.

모든 종류의 동물에서 분비하는 분뇨의 바이러스 (Viruses)는 물을 오염시킨다. 특히 다량이면서 인체건강에 중요한 바이러스는 사람의 장관에 감염하여 분변으로 배출되는 장관계 바이러스이다. 이

들 바이러스는 대부분 분원-경구 경로를 거쳐 사람끼리의 직접접촉을 통하여 감염된다. 그러나 또한 하수나 처리수 및 처리 고형물에 존재하므로 지표수나 토양에 배출되고 따라서 먹는물의 수원으로 쓰이는 지표수나 지하수에 오염될 수 있다[11]. 바이러스는 살아 있는 세포 내에서만 복제와 증식이 가능한 '필연적 세포내 기생체'이다. 감염한 세포 내에서 증식되어 일단 세포 밖으로 방출된 개개의 바이러스 입자 (virion)는 새로운 감염대상 (host)에 침투할 때까지 복제나 증식을 비롯한 물질대사를 수행하지 않는 생물학적 불활성 상태로 존재한다[12]. 일반인들에게는 주로 사람이나 동물에 감염되는 병원성 바이러스들이 많이 알려져 있으나 실제 박테리아부터 고등 동식물에 이르기까지 지구상에 존재하는 모든 생물체들은 각 생물종 (species)에 고유한 다양한 바이러스의 감염대상이 된다. 유전물질인 핵산 (DNA, RNA)과 이를 보호하는 외피 (coat)로 구성되어 있는 아주 단순한 구조를 가지는 병원체로 20~85㎚정도로 크기가 작아 일반 광학 현미경으로는 관찰되지 않는 최소의 단위로 이루어진 생물체이다[13]. 분변에 다량 분비되는 장관계 바이러스로는 Poliovirus, Echovirus 등으로 구성된 장바이러스와 Reovirus, Adenovirus, Rotavirus 등과 같이 급성 감염성 장염을 일으키는 바이러스를 포함한다. Herpatisvirus A를 제외하고는 각 종류는 수가지 이상의 혈청형으로 이루어진 그룹으로 구성되어 총 110개 이상의 장관계 바이러스가 인지되고 있다[14]. 장관계 바이러스는 독자

적으로 살아갈 수 없고, 숙주세포 내에서만 증식이 가능한 세포내 절대 기생체 (intracellular obligate parasites)이다. 이러한 특성으로 인하여 바이러스는 환경에서 세균과는 다른 생태를 갖는다. 즉 환경에서 일반적인 세균보다 생존력이 높고 가장 널리 사용되는 염소 소독에 대한 내성도 세균보다 높다. 바이러스는 대장균과 같은 장내 상주 미생물이 아니다. 이들은 사람에 감염하였을 때만 배출되며, 감염대상은 대부분 아주 어린아이들이다. 감염율은 지역, 위생상태, 사회 경제적 수준에 따라 크게 차이가 있다. 바이러스는 총대장균군보다 아주 낮은 농도로 배출되는데 반드시 살아있는 세포에만 감염하기 때문에 그 수는 하수내에서 증가하지 않는다. 하수처리, 희석, 자연적인 비활성화, 그리고 정수처리는 바이러스 수를 크게 감소시킨다[15]. 그러나 매우 적은 단위의 바이러스에 오염된 물을 공급받는 지역의 개개인에 발생하는 감염 위해성은 아직 결정되지 않았다. 위해성 평가는 먹는 물에 있는 아주 낮은 수의 바이러스에도 유의한 감염위험이 있다고 제시하고 있다. 장관계 바이러스는 모든 감염성 바이러스가 항상 발병하는 것이 아니고 종류 및 독성 type에 따라 위험도가 매우 달라 대략적이며 넓은 범위의 위험도만이 산정 가능하다[16]. 현재 바이러스의 수질기준은 미국과 프랑스를 제외한 대부분의 나라에서는 현재 법정항목으로 규정되어 있지 않으며 몇몇 나라에서는 도입준비단계에 있다[17]. 먹는 물에서 바이러스의 오염은 1960년대 초에 프랑스 파리에서 최초로 바이러스를 분

리하였고 그 후 세계 각국에서 바이러스 오염이 발표되었다. 1980년대 이후의 장관계 바이러스의 분리 현황을 보면 대부분 미처리시나 소독처리만을 시행했을 시에 검출되었고, 완전 처리시 검출된 경우도 있으나 이러한 경우는 선진국보다는 중남미, 중국 등이었다. 음용수의 바이러스 오염에 대한 종합적인 조사는 캐나다, 영국, 이스라엘, 네덜란드, 루마니아, 및 미국에서 실시되었는데, 네덜란드와 미국의 경우는 정수에서 바이러스가 검출되지 않았으나, 그 외의 나라에서는 조사한 시설수의 10~71%에서 바이러스가 검출되었다. 대부분 20~1900L의 물을 여과처리 하였지만 양성반응은 검사 시료수의 4~7%이고, 검사 바이러스량은 0.005~0.87 PFU/L의 미량이었다[15]. 미국의 경우 바이러스에 의한 발병은 초기인 1940년대 이전에는 거의 인지되지 않다가 점차 높아져 1960년대에 23%로 가장 높게 나타났으나 1970년대 이후 대략 8~9% 가량을 차지하고 있다. 대부분 미국에서 인지된 바이러스 발병은 미처리 혹은 부적절하게 처리된 개인 급수나 간이 상수도에 명백하게 하수가 오염되었을 때에 발생하였다. 지역단위 급수에서의 바이러스 발병은 일반적으로 배급수관을 통한 오염에 기인한다. 오늘날 바이러스의 상시분석은 권장하고 있지 않으나 폐수의 재이용시, 질병의 발생시, 특정 목적의 연구 등 특별한 상황하에서는 바이러스의 분석이 필요하다[17]. 현재 바이러스 분석의 표준 시험방법은 총세포배양법이다. 이 방법은 미국 EPA와 환경부에서 규정한 방법으로 특별하게 장비가 갖추어

진 실험 시설에서 일하는 훈련된 바이러스 학자에 의해서 행해져야 한다. 다량의 시료를 필터로 여과 채취하여 농축하여 숙주세포에 감염시키는 방법으로 미국 EPA에서 제정한 ICR/TCVA 방법에서 권장하는 전통적인 방법이다[18]. 1996년 발효된 미국 환경청의 Information Collection Rule (ICR)에 의하면 10만 이상의 가구에 물을 공급하는 경우에는 적어도 한 달에 한번씩 18개월 동안 바이러스를 검색해야 하고, 이 때 바이러스를 검출하기 위해 사용하는 방법은 Buffalo green monkey kidney (BGMK) 세포에서 세포병변효과 (Cytopathic Effect : CPE)를 일으키는 감염성 바이러스의 수를 Total Culturable Virus Assay-Most-Probable Number (TCVA-MPN)로 나타낸다고 규정하고 있다. 또 한 가지 방법으로는 PCR (Polymerase Chain Reaction)이 있는데 이는 시료에서 바이러스 핵산을 추출하여 이를 효소적으로 증폭시키는 방법으로 매우 신속하고 민감한 방법으로 여러 가지 질병의 진단에 널리 이용되고 있는 방법으로 현재 전 분야의 생명과학에서 사용하고 있다. 그러나 이 방법은 사멸된 바이러스도 검출한다는 단점이 있어 이 방법으로 바이러스가 검출된다고 하여 반드시 위험한 것은 아니다[19]. PCR에 이용되는 primer는 대부분의 장관계 바이러스에서 보존적으로 나타나는 염기서열에서 pan-enterovirus primer쌍이 널리 이용되지만, 경우에 따라서는 바이러스에 특이적인 primer를 이용할 필요성이 있다. PCR 산물의 염기서열을 결정함으로써 오염된 장관계 바이러스의

종류를 확인할 수 있다[20]. 이런 장관계 바이러스는 수질이 오염된 취수원에서 얼마든지 발생할 수 있기 때문에 이에 대한 대책이 요구되어진다. 상수도는 염소소독을 실시함으로써 수인성 병원미생물을 제거하여 수인성 질병으로부터 공중보건을 보호하는데 중요한 역할을 하여왔다. 그러나 최근 염소 소독제에 저항력을 갖는 바이러스, 크립토스포리디움 등의 몇몇 미생물로 인해 상수도는 강하게 도전을 받고 있다. 장관계 바이러스는 물에서 수개월 이상 안정적으로 존재할 수 있으며, 세균에 비하여 염소 소독에 대한 저항성이 강하여 완전정수처리를 거친 정수에서도 바이러스 검출이 보고되고 있다[15]. 국내에서도 한강, 낙동강 등의 원수에서의 바이러스 검출이 보고되었으며, 특히 중·소규모 정수장 4곳의 정수에서 100리터당 0.1~2.7마리, 가정 급수전 4곳에서 100리터당 0.1~33.5마리 검출되어 지표수를 상수원으로 하는 부산시의 정수장에서도 간과할 수 없게 되었다.

본 연구의 목적은 위에서 서술한 배경을 바탕으로 낙동강 수계 하류지역에서 가장 현안이 되고 있는 대표적인 유해 생물체인 남조류와 바이러스의 분포현황을 체계적으로 조사하고 아울러 분리를 실시하여 계절적 특성 등 오염실태를 정확히 밝히고, 또한 검출된 유해 생물체를 효과적으로 제거할 수 있는 방법을 확립하는데 있다.

제 1 장

낙동강 하류 수계에 분포하는 남조류 *Microcystis aeruginosa*의 무균분리 및 16S rRNA 유전자 염기서열분석

Abstract

For axenic isolation of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, water bloom at the Mulgum station from the Nakdong River was pretreated by shaking with distilled water. Removal of bacteria was accomplished using antibiotics (150 $\mu g/m\ell$ ampicillin and 25 $\mu g/m\ell$ neomycin) and colonizing on CB solid medium prepared from 0.7% agarose at 30℃ under 40 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ light. Among 26 strains of the *Microcystis* species, only three strains were axenically established. The three strains were examined by PCR-amplified 16S rRNA gene and 16S rRNA sequencing. The similarities were 99.5 ~ 100% with *M. aeruginosa* AF 139292.

Key words : Agarose, Antibiotics, *Microcystis aeruginosa*, PCR, 16S rRNA primer

서 론

호소에서의 부영양화가 진행됨에 따라 호소내 식물플랑크톤의 대량증식이 빈번히 일어나며 특히 수온이 높은 시기에는 남조류가 대량 증식하여 수표면에 물꽃을 형성하여 수체내 pH 상승, 어류의 폐사, 이·취미 발생 및 정수처리 과정의 여과 폐쇄 등 수 이용상에 많은 문제를 일으킨다[35]. 이런 남조류 중에서도 대표적인 종인 *Microcystis*는 전 세계적으로 넓게 발생하고 있는 대표적인 녹조현상 원인 속 (genus)으로, 우리나라에도 낙동강, 대청호, 팔당호 등에서 *Microcystis* 발생이 보고되고 있다[39]. *Microcystis*의 대량번식은 물의 투명도를 저하시켜 수표면 아래 광 투과가 거의 차단되고 부유력이 왕성한 남조류 이외의 다른 조류의 성장을 억제한다. 종 다양성이 감소하고 수표면 아래층의 광합성이 저해를 받아 저층으로 갈수록 DO가 고갈되어 수질을 악화시키게 한다[36]. 따라서 *Microcystis*는 수질오염에 대한 생물학적 지표가 된다[25]. *Microcystis*의 세포는 매우 작은 구형으로 피막 속에 빽빽히 모여 군체를 이루며, 세포 내에 기포를 가지고 있어 수면에 떠올라 scum을 뛴다. *Microcystis*는 이 점액질로 인하여 세균과 집락으로 단단히 결합하고 있어 무균적으로 분리한다는 것은 상당한 기술과 시간이 요하는 등 어려움이 있는

실정이다. 그러나 생리학적, 유전학적, 분류학적 연구를 위해서는 무균의 *Microcystis*를 분리 배양하는 것은 기초가 되는 중요한 일이다. 현재까지 알려져 있는 *Microcystis*를 무균적으로 분리하기 위한 방법에는 자외선 조사, 화학물질 처리, 항생물질 첨가, micro pippet에 의한 직접 분리, 고체배지를 사용한 무균적인 colony 분리 등이 주로 이용되고 있다[23,25]. 최근에는 DNA 염기서열, GC ratio, 색소 합성 (pigment composition) 등이 새로운 방법으로 사용되고 있다는 보고가 있다[6].

본 연구는 1987년 하구언 축조 이후 많은 생태계 변화를 초래하고 부영양호의 특징을 가지고 있는 낙동강 하류지역의 물금 취수원을 대상으로 수화를 일으키는 여름철의 대표적 지표종인 *Microcystis aeruginosa*를 여러 가지 방법 중 고체배지를 사용하여 자연수화로부터 무균적으로 분리하고자 하였다. 또한 분리한 무균균주를 16S rRNA primer를 이용하여 유전자를 증폭한 후 염기서열을 분석하여 동일 strains 여부를 확인하였다.

재료 및 방법

1-1. 조사지점

낙동강 하류의 물금 취수원을 대상으로 *Microcystis* sp.가 표층에 scum을 형성한 1997년 9월초와 10월초 사이에 4회 채취하여 실험하였다.

1-2. 이화학 및 생물학적 조사

수온 및 pH는 온도계 및 pH meter (Orion, Model 260)로 현장에서 측정하였으며, 생물학적 산소요구량 (BOD)은 시료를 5일 동안 20℃로 저장하여 Winkler 변법에 따라 측정하였다[21]. 화학적 산소요구량 (COD)은 $KMnO_4$법으로 측정하였고, 암모니아성 질소 (NH^+_4-N)는 Indophenol법에 의해 흡광도 640 nm에서 측정하였다[21].

엽록소 농도는 500 ㎖의 시료를 0.45 ㎛ filter로 여과시킨 후 90% acetone 용액에서 24시간 동안 엽록소를 추출하였다. 이때 엽록소의 불안정화를 막기 위하여 포화 $MgCO_3$ 용액으로 세척하였다. 추출된 용액을 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 각각 750, 664, 647, 630 nm에서의 흡광도를 측정하여 trichromatic method의 계산식에 따라 엽록소 a의 양을 계산하였다[21]. 조류 동정은 채수한 표층수 1 L를 15 ㎛ 체로 걸러 최종적으로 20 ㎖ 되게

농축한 후, 중성 포르말린 1~2 ㎖로 고정하여 Sedgwick-Rafter chamber로 계수하였으며 ㎖당 세포수로 환산하여 현존량으로 표시하였다. *Microcystis* sp.의 경우 군체를 이루는 종이기 때문에 개개의 세포수를 모두 계수하였다. 종속영양세균은 R_2A agar (Difco사) 평판배지에 시료 1 ㎖를 도말 한 후 25℃ 배양기에서 14일간 배양하여 형성된 집락을 계수하였다.

1-3. *M. aeruginosa*의 무균분리 및 16S rRNA gene sequence

먼저 *Microcystis* sp. 이외의 다른 부유물질을 제거하기 위해 60 ㎛ 망목으로 시료를 거른 후 현미경으로 군체의 형태 및 세포의 크기, 이형세포의 위치 등을 분류 key로 하여 관찰한 결과 조류 우점종은 *Microcystis aeruginosa*로 동정되었다[23]. 배양 배지는 CB배지로 pH를 9.0으로 조정하여 사용하였다[28].

시료중의 *M. aeruginosa*에 부착되어 있는 세균들을 많이 탈락시키기 위하여 우선 멸균 증류수 세정법, phenol 처리법, penicillin G 항생물질 첨가법 그리고 phenol과 penicillin G 혼합법을 각각 사용하여 암실에서 1시간 방치하였다[24,30]. 그리고 많은 수의 집락들을 분리하기 위해서는 vortex, homogenize 그리고 lysozyme (20 ㎎/㎖) 처리를 시간별로 처리하였다.

이렇게 전처리한 시료는 각종 항생제에 의한 *M. aeruginosa*의 증식에는 영향을 미치지 않으면서 오염세균들은 억제시킬 수 있는 농

도를 조사하기 위하여, 전 배양한 *M. aeruginosa* 10 ㎖를 multi-well plate에 분주한 후 항생제 종류별로 500 ㎍/㎖ 농도까지 첨가하여 30℃, 40 μmol m^{-2} s^{-1} 광 조건으로 1일간 정치 배양한 후 ㎖당 세포수를 측정하였다. 각 항생제 농도에 따른 성장곡선에서 MNLC (maximum non-lethal concentration, 즉 생육에 영향을 미치지 않는 범위 내에서의 최대농도), LC_{50} (lethal concentration 50, 즉 50% 생육 저지농도), MLC (minimum lethal concentration, 즉 100% 생육 저지 범위 내에서의 최소농도) 농도를 결정하였다.

무균상태의 *M. aeruginosa* 집락을 분리하기 위하여 사용된 고체 배지는 CB 배지이며, 6종류의 고형화 gelling agent를 농도별로 실험하여 집락 형성이 좋은 gelling agent를 엽록소 a 함량 측정으로 비교 선정하였다. 형성된 집락의 무균 상태 여부확인은 백금이로 각 집락을 취해 CB 액체배지 (5 ㎖)에서 같은 조건으로 2주 동안 배양한 후 현미경으로 우선 확인하였다. 액체배지 (100 ㎖)에 다시 접종하여 동일한 조건으로 대량 배양한 후[25] 배양된 *M. aeruginosa* 를 Nutrient agar, Potato dextrose agar와 Tryptone broth agar 고체배지에 접종하여 30℃, 10일 동안 배양한 후 세균 오염여부를 최종적으로 확인하였다[24].

남조류 분리 균주들은 주어진 배양조건에 따라서 특정적인 세포 모양이 결핍되거나 형태가 변형되기 쉽기 때문에, 형태학적으로 종을 정확하게 구분하기 어렵다[31,32]. 따라서 본 실험에서는

small-subunit ribosomal RNA (16S rRNA)의 암호화된 gene의 염기서열을 이용한 분석방법을 수행하여 분리한 *Microcystis* 무균균주의 동일 strain 여부와 *Microcystis*속 간의 homology를 확인하고자 하였다[33].

1-4. DNA 추출 및 정제

무균적으로 분리한 *Microcystis aeruginosa*의 DNA를 추출하기 위하여, 배양한 *M. aeruginosa* 세포 ($2\times10^5\sim10^7$)를 6000 rpm으로 원심분리하여 수거하였다. 이를 Lysis Buffer (0.01M Tris(pH 7.8), 0.005M EDTA, 0.5% SDS) 500 ㎕에 Proteinase K (20 ㎎/㎖)를 최종농도 50 ㎍/㎖이 되도록 넣고 잘 섞은 후 56℃에서 2시간이상 반응시켰다. 반응 후 각 튜브에 동량의 phenol을 넣고 30초간 조심스럽게 inverting하고, 30초간 정치시켰다. 12,000 rpm, 15분간 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 새로운 튜브로 옮겨, 여기에 1:1이 되도록 phenol과 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 12,000 rpm, 15분간 원심 분리하여 상등액을 새로운 튜브로 옮겼다. 동량의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 12,000 rpm, 15분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 1/10 부피의 3M sodium acetate를 넣고, 2.5배의 ethanol을 넣고 1시간이상 침전시켰다. 12,000 rpm, 10분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 70% ethanol을 넣고 세척하여 이를 PCR의 주형으로 사용하였다[31].

1-5. PCR 증폭

물금 지역에서 분리한 남조류의 염기서열분석을 위한 primer쌍은 현장시료에 많이 분포하는 특이적인 primer를 작성하기 위하여, Gene Bank상에 나와있는 20여 가지의 남조류의 16S rRNA종을 비교 분석하여 primer를 작성하였는데 이를 CJM 198F, CJM 1141R (Table 1-5)로 명명하였다[22]. 이 두 가지의 primer를 PCR에 사용하였다.

PCR 반응액은 총 100 $\mu\ell$ volume {DNA (1-100ng), 10× reaction buffer, 1.5mM $MgCl_2$, primers (CJM 198F, CJM 1141R 각각 50 pmol/$\mu\ell$), 5 U/$\mu\ell$ Taq polymerase (Takara사)이 되도록 하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR은 95℃에서 30초, 56℃에서 45초, 72℃에서 45초 동안 40번을 반복시켜 PCR 산물을 얻었다. PCR 반응 결과 생겨난 산물을 1% agarose gel에 전기 영동하여 약 943 bp band 형성 유무를 확인하였다.

1-6. 염기서열분석

위에서 얻은 PCR 산물을 pT7-blue T Vector (Takara사)에 cloning하고 plasmid DNA를 추출하여 DNA autosequencer ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 분석은 Gene Bank에 의뢰하여 기존에 알려진 남조류들의

염기서열과 그 유사성을 비교하였다.

1-7. 균주보관

무균적으로 분리한 *M. aeruginosa*는 20%의 glycerol를 첨가하여 -70℃에 동결 보존시켜 두었다가 실험시 계대 배양하여 사용하였다.

결과 및 고찰

1-1. 시료수의 수질

시료를 채수한 시점의 이화학적 조사 결과 수치가 대부분 오염 정도가 높은 경향을 보였다 (Table 1-1). 수온은 평균 25.2℃, pH 8.6으로서 남조류가 증식하기에 알맞은 조건을 갖추고 있는 것으로 나타났다. 수질오염의 대표적인 지표인 BOD, NH^{+}_{4}-N는 각각 4.7, 0.07 ㎎/L범위로 나타났는데 BOD의 경우 상수원수 3급수 기준인 5 ㎎/L에 육박하여 유기물 오염이 상당히 악화되었음을 보여 주고 있다. 이는 남조류에 의한 수화현상이 어느 정도 진행되었기 때문인 것으로 생각된다[41]. 특히 현미경 관찰에 의한 조류 우점종은 *M. aeruginosa*가 대부분이었으며 (약 97%), 그 외 *Anabena*속, *Oscilliatoria*속 등이 드물게 관찰되었다.

1-2. *M. aeruginosa*의 무균분리

*Microcystis*의 증식에 영향을 미치는 요인은 온도, 조도, pH, 교반상태, 인, 질소 등이 있다[27]. *Microcystis*는 자연계에서 군체 형성을 하는 특징을 가지고 있으나, 실내에서 플라스크 배양시 군체의 형성능을 상실하여 군체 배양이 어렵다고 알려져 있다. 그러나 본 실험의 물금에서 분리한 *Microcystis*는 플라스크 배양시에도 군체를 형성하였다.

Yagi와 Sudo에 의하면 실내에서의 *Microcystis*의 증식 조건을 검토해 보았을 때 먼저 온도가 25~35℃에서의 비증식속도 (specific growth rate) μ=0.25 day^{-1}로 높게 나타났으며, 또한 교반 조건에서는 70 rpm 진탕배양시 μ=0.25 day^{-1}로 정치배양시 μ=0.18 day^{-1}보다 성장이 빠른것으로 조사되었다. 그리고 조도의 경우 광포화점 이상인 40 μmol m^{-2} s^{-1}에서 μ=0.5 day^{-1}로 가장 높은 것으로 보고되었다[35]. 따라서 이들 조건에 대한 영향을 고려하여 예비시험을 실시하였는데, 30℃, 40 μmol m^{-2} s^{-1}, 70 rpm 조건이 다른 조건보다 비증식속도가 높은 것으로 나타나[34] 본 실험에서는 *Microcystis*를 이 조건으로 배양하였다.

무균화를 위한 전처리 방법에서는 멸균 증류수를 이용한 세정법에서만 무균 *M. aeruginosa* 균주를 얻을 수 있었으며, 그 외 방법에서는 분리하지 못했다. 많은 수의 집락이 형성될 수 있도록 하기 위한 cell dissociation 방법에서는 vortex, homogenize 순으로 집락이 형성되었다. 그러나 lysozyme 처리에서는 집락이 형성되지 않았는데 이는 lysozyme이 cell 자체를 파괴시키기 때문인 것으로 생각되어진다. 시간별 *M. aeruginosa* 집락 형성에서는 vortex 2분 처리에서 가장 많은 수의 집락이 형성되는 것으로 나타났다 (Table 1-2).

세균제거 및 무균 상태를 계속 유지하기 위하여 8종의 항생물질을 처리하여 *Microcystis*에는 영향을 주지 않고 일반 세균들은 생육하지 못하는 농도를 결정하기 위하여 *Microcystis*에 대한 각 항생물

질별 MNLC, LC_{50} 및 MLC 농도 실험결과는 Table 1-3과 같다. 실험 결과에서 *Microcystis*가 높은 내성을 나타낸 항생제인 ampicillin 및 neomycin만의 MNLC 농도들을 섞어 만든 antibiotic cocktail (ampicillin 150 ㎍/㎖, neomycin 25 ㎍/㎖)을 배지에 첨가하여 세균 제거 및 무균상태 유지를 위해 사용하였다.

이렇게 무균처리된 *M. aeruginosa* strain들을 독립 집락으로 형성시켜 오염 기회를 줄이기 위하여 고체배지에 배양하였다. 고체배지의 gelling agent 종류별에 따른 성장 조사는 고체배지에 자란 집락을 모두 회수하여 엽록소 a 함량을 측정함으로써 상대적인 성장도를 비교하였다. Table 1-4에서 보는바와 같이 agarose, high gel strength agar, phytagel, agar 순으로 성장을 보였으며, transfer gel, alginic acid를 사용한 고체배지에서는 집락을 형성하지 않았다. agarose와 agaropectin으로 이루어져 있는 agar와 다른 gel들은 다양한 불순물을 함유하고 있는데 이 불순물에는 남조류 성장을 저해하는 수용성 용해 agent 성분이 있어 이것에 의해 남조류의 성장이 억제된 것으로 보여진다[25]. 높은 성장을 보인 agarose 중에서도 0.7% 농도에서 가장 높은 성장을 보였다.

낙동강 하류지역에서 발생하고 있는 대표적인 *Microcystis*는 6종류인데 (Table 1-6)[6], 본 실험의 물금 지역 수화로부터 분리한 대표적 *Microcystis* strain (Fig. 1-1)은 세포의 직경이 대부분 3~4 ㎛이고 군체의 형태가 부정형이며 상피막이 명료한 것이 특징인 *M.*

*aeruginosa*였다[6,28,30].

1-3. PCR 증폭

낙동강 물금 지점에서 무균 분리한 3개의 *M. aeruginosa* strain를 각각 순수 배양하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 주형으로 하여 합성한 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 1% garose gel을 사용하여 전기영동을 실시한 결과 3개 모두 943 bp의 16S rRNA의 band를 관찰할 수 있었다 (Fig 1-2).

1-4. 염기서열 분석

이들의 염기서열 분석을 위하여 각각의 PCR 산물을 정제하여 pGEM-T vector (Promega사)에 cloning하고 다량의 DNA를 순수 정제하여 염기서열을 분석하였다. 본 연구에서 합성한 16S rRNA를 사용하여 무균 분리한 3개의 *Microcystis aeruginosa* strain에 대한 3차례의 염기서열 분석결과 3개의 sample 모두가 *M. aeruginosa* AF 139292의 16S rRNA 염기서열과 비교했을 때 유전적 거리가 가장 가까웠으며 (0.0021~0.0064) 이들간의 염기서열 상동성은 99.5~100%인 것으로 확인되었다. (Fig. 1-3, Tabie 1-7). 한편 무균분리된 3개의 sample과 NCBI에 등록된 *Microcystis* sp. 5종과의 유전적 유연관계를 살펴본 결과, 분리된 3개의 sample은 동일한 종인 것으로 확인되었다 (Fig. 1-4).

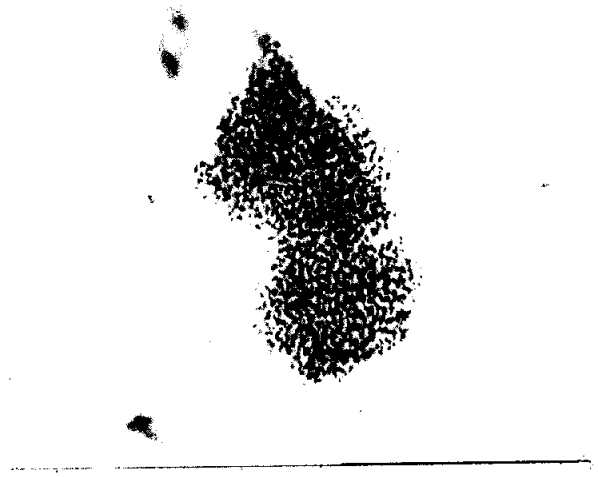
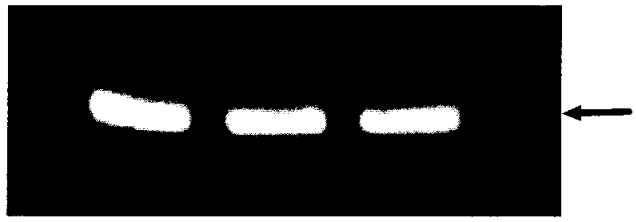


Fig. 1-1. Typical colony of *Microcystis aeruginosa* isolated at the Mulgum station from the Nakdong river (×200)



943 bp

1 2 3

Fig. 1-2. PCR amplification of the 16S rRNA region of *Microcystis* from an environmental bloom. *Microcystis* bloom samples collected in Nakdong River.

1 : Mul gum-1, 2 : Mul gum-2 , 3 : Mul gum-3

1gtaaggggcatgctgacttgacgtcatccccaccttcctccggtttgtcaccggcagtct AF139292

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

61ccttagagtccccaacttaatgctggcaactaagaacgagggttgcgctcgttgcgggac

----------c---------- sample 1

----------c---------- sample 2

---------- sample 3

121ttaacccaacatctcacgacacgagctgacgacagccatgcaccacctgtgttcgcgctc

---------- sample 1

----------c---------- sample 2

---------- sample 3

181ccgaaggcacccccagctttcaccagggttcgcgacatgtcaagtcttggtaaggttctt

---------- sample 1

----------a---------- sample 2

---------- sample 3

241cgcgttgcatcgaattaaaccacatactccaccgcttgtgcgggcccccgtcaattcctt

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

301 tgagtttcacacttgcgtgcgtactccccaggcgggatacttaacgcgttagcttcggca

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

361 cggctcgggtcgatacaagccacgcctagtatccatcgtttacggctaggactacagggg

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

421 tatctaatccctttcgctcccctagctttcgtccctgagtgtcagatacagcccagtagc

---------- sample 1

---g---------- sample 2

---------- sample 3

481 acgctttcgccaccgatgttcttcccaatctctacgcatttcaccgctacactgggaatt

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

541 cctgctacccctactgctctctagtctgccagtttccaccgcctttaggtcgttaagcaa

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

601cctgatttgacggcagacttggctgaccacctgcggacgctttacgcccaataattccgg

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

661ataacgcatgcctcccccgtattaccgcggctgctggcacggagttagccgaggctgatt

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

721cctcaagtaccgtcagaacttcttccttgagaaaagaggtttacaatccaaagaccttcc

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

781tccctcacgcggcgttgctccgtcaggctttcgcccattgcggaaaattccccagtgctg

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

841cctcccgtaggagtctgggccgtgtctcagtcccagtgtggctgctcatcctctcagacc

---------- sample 1

---------- sample 2

---------- sample 3

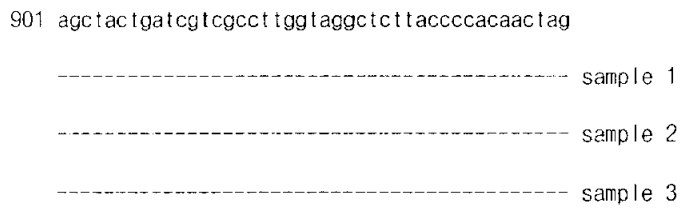


Fig. 1-3. 16S rRNA sequence of *Microcystis aeruginosa* from Nakdong River aligned with that of *M. aeroginosa* (AF 139292).
Mulgum-1 sample(1); Mulgum-2 sample(2); Mul gum-3 sample(3)

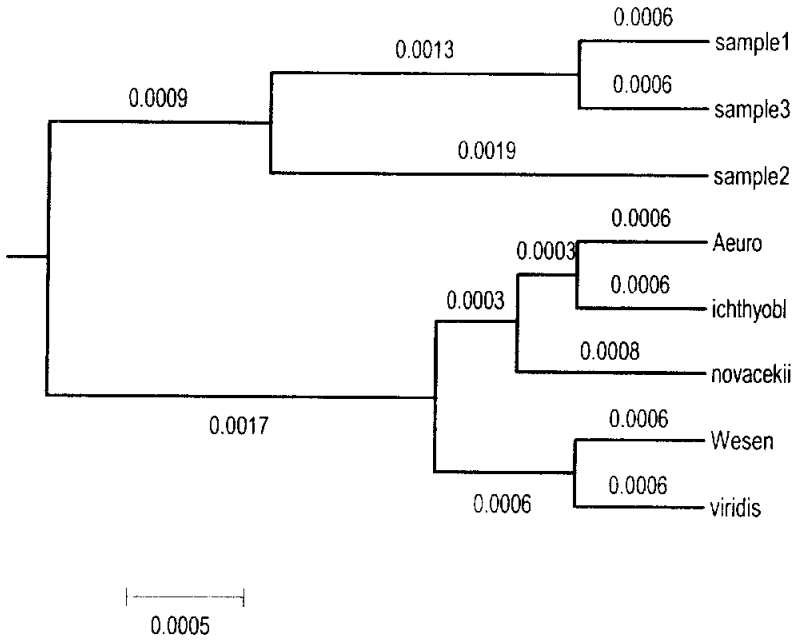


Fig. 1-4. Phylogenetic dendrogram of isolated strains (sample 1, 2 and 3) and 5 species of *Microcystis* in downstream of Nakdong River derived from 16S rRNA sequence.

Table 1-1. Water quality at the Mulgum station from the Nakdong River. Values are expressed as average from four measurements during September to October, 1997.

Parameter	Result
pH	8.6
Temperature (℃)	25.2
BOD (㎎/ ℓ)	4.7
COD (㎎/ ℓ)	8.0
NH^{+}_{4}-N (㎎/ ℓ)	0.07
Chlorophyll-a (㎍/ ℓ)	87
Dominant species	*M. aeruginosa* ($1.08x10^{4}$ cells/㎖)
HPC (CFU/㎖)	$1.2x10^{5}$

Table. 1-2. Effect of pretreatment for cell dissociation. The result was expressed as colony formation unit (10^3 CFU/㎖).

Treatment	Contact time (min)			
	0.5	1	2	3
Vortex	3.1	7.3	8.2	2.2
Homogenize	6.9	7.4	3.0	0
Lysozyme	0	0	0	0

Table 1-3. Resistance of *M. aeruginosa* to several antibiotics. The resistant concentration was determined from the dose-response curve against antibiotic concentrations.

Antibiotics	MNLC (㎍/㎖)	LC_{50} (㎍/㎖)	MLC (㎍/㎖)
Ampicillin	150	175	400
Carbenicilin	0.3	1	12
Chloramphenicol	0.2	1	4
Gentamycin	0.5	2	35
Kanamycin	5	25	50
Neomycin	25	100	500
Streptomycin	4	18	50
Tetracycline	0.5	2	25

Table 1-4. Amount of chlorophyll-a ($\mu g/\ell$) from the *M. aeruginosa* cells grown on solid media prepared with different gelling agents.

Solid media	Gelling agent (%)				
	1.5	1.0	0.7	0.4	0.2
Agar	0	0	6	3	0
Agarose	6	19	83	50	3
Alginic acid	0	0	0	0	0
High gel strength agar	2	20	7	10	0
Phytagel	0	15	18	0	0
Transfer gel	0	0	0	0	0

Table 1-5. Primer pairs used for the detection of cyanobacteria.

Target	Sequence(5′-3′)
16S rRNA of Cyanobacteria	CJM 198F 5′-cgatcggtagctggtctgaga-3′ CJM 1141R 5′-cattgtagtacgtgtgtagccca-3′

Table 1-6. The morphological comparisons of 6 species of *Microcystis* in the Nakdong River.

Species	Cell dia.(㎛)	Colony shape	Cell arrangement
M. incerta	1.1~2.0	spherical, elongated	compact, irregularly flattened
M. viridis	4.0~6.1	rectangular, cubic subcolonial unit	regular arrangement of 8 cells three perpendicular planes
M. wesenbergii	4.8~6.4	spherical, elongated lobate, budding	loose and uneven distribution linear peripheral arragement
M. novacekii	2.2~4.8	spherical, moniliform	firm, dense
M. ichthyoblabe	2.3~4.1	spherical, irregular compound	soft aggregation, delicate
M. aeruginosa	3.6~6.6	spherical, elongated lobate, clathrate, reticulated, perforate	firm, dense

Table 1-7. Genetic distance of isolated strains (sample 1, 2 and 3) and 5 species of *Microcystis* in downstream of Nakdong River derived from 16S rRNA sequence.

Species	sample 1	sample 2	sample 3	aeru.	wesen.	viri.	ichthy.	nova.
sample 1	0.0000							
sample 2	0.0032	0.0000						
sample 3	0.0011	0.0043	0.0000					
aeru.	0.0032	0.0064	0.0021	0.0000				
wesen.	0.0053	0.0086	0.0043	0.0021	0.0000			
viri.	0.0064	0.0096	0.0053	0.0032	0.0011	0.0000		
ichthy.	0.0043	0.0075	0.0032	0.0011	0.0032	0.0021	0.0000	
nova.	0.0053	0.0086	0.0043	0.0021	0.0021	0.0011	0.0011	0.0000

제 2 장

응집제 Ceramic-Zeolite type과 황토를 이용한 *Microcystis aeruginosa* 제거에 관한 연구

Abstract

For the proposal of *Microcystis aeruginosa* control technique by coagulants, removal effects of coagulants were carried out using isolated strain and collected water bloom of *M. aeruginosa* on Downstream of the Nakdong River. Both of purified and field-collected *M. aeruginosa* were entirely sedimented by the addition of the coagulant Ceramic-Zeolite type Co 100 (1.5 ㎎/L) within 24hr, but Yellow loess (10 ㎎/L) was less effective for the removal of *M. aeruginosa* within 24hr. Thus it was concluded that Ceramic-Zeolite type Co 100 was the most effective coagulant.

Key words : Coagulant, *Microcystis aeruginosa*, Ceramic-Zeolite type Co 100

서 론

조류는 현미경적 크기로서 수중 부유 생활을 하며 chlorophyll 색소에 의한 광합성을 하는 하등 식물군으로서 해수보다는 담수에 풍부하게 서식한다. 조류의 증식에 영향을 미치는 제 요인들은 상당히 다양하고 이런 요인들이 복합적으로 작용하여 증식에 영향을 미치게 된다. 이러한 환경요인들 중 특히 영양염의 농도와 수온, 조도 그리고 광합성을 하는데 필요한 광량 등의 호조건하에서 양적인 증식을 일으켜 수면이 조류로 뒤덮이는 수화현상 (blooming)을 일으켜 수중 생태계에서 1차 생산성을 촉진하기도 한다[40]. 최근에 국내 여러 수계가 부영양화되어 남조류가 대량 증식하는 현상이 나타나고 있다[41]. 남조류의 발생은 정수공정에서 문제를 일으키며, 수자원의 가치를 하락시키고 특히 일부 남조류가 가축이나 인간에게 유해한 독성물질을 생산하는 것으로 알려져 생리생태학적 연구의 대상뿐만 아니라 공중 보건학적으로 심각한 문제를 일으키고 있다[39]. 낙동강에서도 매년 주기적으로 남조류 특히 *Microcystis*가 하절기에 번무하여 하류지역의 수질이 악화되는 경향을 보였다[37].

'Nuisance algae'인 남조류를 제어하는데 일차적으로는 질소, 인 등의 영양염 부하를 줄이는 등의 방법이 있으나 일단 대량증식한 남조류를 제거하기 위한 손쉬운 방법은 살조제를 사용하는 것이다.

지금까지 사용된 살조제 중에서 가장 경제적이고 효과적인 살조제는 황산동[42]과 염소 등이 알려져 있다. 그러나 과도하게 유입된 황산동 등의 살조제에 의해 조류내부의 유기물질이 용출되어 유기물의 처리를 저하시키거나, Disinfection by-products (DBPs)를 발생시키는 등 생태계 악영향의 우려로 인해 현재는 그 사용을 피하고 있는 실정이다[43]. 이러한 이유로 인해 외국에서는 보리짚을 이용한 조류 제어 방법이 보고되고 있으나[44], 최소 6~8개월이 지나야 조류억제효과가 나타나고, 또한 geosimin, 2-MIB 등의 이취미 물질과 phenol 등의 유해물질이 부차적으로 생성되어 직접적으로 이용하는 것은 다소 무리가 따를 것으로 생각되어진다. 한편 국내에서도 황산동에 citric acid를 첨가한 copper-citrate[45], 중금속[46], 식물체[47]를 이용한 조류증식억제에 대한 결과가 보고되는 등 그 연구가 진행되고 있는 중이다.

본 연구는 1987년 하구언 축조 이후 많은 생태계 변화를 초래하고 부영양호의 특징을 가지고 있는 낙동강 하류지역의 물금 취수원에서 항생물질 첨가 및 세균 검사 등으로 무균 분리한 *Microcystis aeruginosa*와 서낙동강 녹산 지점에서 채수한 시료중의 *M. aeruginosa*을 대상으로 응집제 Ceramic-Zeolite와 황토 등을 사용하여 *M. aeruginosa*에 대한 응집 침전 제거능력을 비교 조사하였다.

본 실험에 사용된 응집제 Ceramic-Zeolite type은 안동대학교 최식영 교수 실험실에서 조제한 것으로 바다 적조제거에 탁월한 효과

를 보인 것으로 알려져 있는데[48] 담수 녹조현상을 일으키는 *Microcystis aeruginosa*에서도 제거효과가 있는지의 여부를 확인 하고자 하였다.

재료 및 방법

2-1. 공시조류

본 실험에 사용한 남조류 *M. aeruginosa*는 낙동강 하류의 물금 취수원에서 무균적으로 분리한 조류로서 CB 배지에서 계대배양 하였으며, 배양조건은 30℃, 40 μmol m^{-2} s^{-1}, 70 rpm으로 2주 동안 진탕 배양하였다[49]. 또한 현장에서의 *M. aeruginosa* 제거 효과실험은 1999년 7월 수화를 형성한 서낙동강 녹산 지점에서 3회 채수한 시료를 대상으로 실시하였다.

2-2. 배지조성 및 배양

공시조류의 배양배지는 CB 배지($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 150 ㎎, KNO_3 100 ㎎, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 40 ㎎, β-disodium glycerophosphate 50 ㎎, bicine 500 ㎎, biotin 0.0001 ㎎, vitamine B_{12} 0.000 1 ㎎, thiamine hydrochloride 0.01 ㎎, PIV metal 3 ㎖/L)를 사용하였다. -70℃에 동결 보존된 *M. aeruginosa* 균주를 CB 액체배지 5 ㎖에 접종, 전배양한 후 다시 액체배지 200 ㎖에서 대량 배양하여 실험에 사용하였다.

2-3. 응집제에 의한 *M. aeruginosa* 제거

응집제에 의한 *M. aeruginosa*의 침전제거 효과를 비교하기 위해서 먼저 순수 배양한 *M. aeruginosa* 배양액 200 ㎖를 300 ㎖ 용량의 BOD병에 각각 분주한 후, 응집제 종류별로 첨가하여 30℃, 40 μ mol m^{-2} s^{-1} 광 조건으로 정치배양하면서 1시간 및 24시간 후에 상층 90 ㎖ 및 하층 90 ㎖ (침전부분 20 ㎖ 제외) 부위의 시료를 각각 취한 후, 각각을 잘 흔들어서 1 ㎖당 세포수를 조사하였다. 또한 현장에서 채취한 *M. aeruginosa*도 같은 조건으로 배양하여 실험하였다.

본 실험에 사용된 응집제 Ceramic-Zeolite 4종의 원소함량은 Table 2-1과 같다. Ceramic-Zeolite는 사암의 일종인 암석분말 (D)과 석분 (Co)을 원료로 하여 반응시킨 물질이다. 제조 방법은 먼저 사암분말과 석분을 0.1 mm이하로 파쇄하여 무게비로 각각 1:1, 3:7, 7:3, 석분 100%로 혼합하여 성형이 가능할 정도로 물을 첨가하여 10 mm 구형으로 성형을 한다. 이를 다시 150~300℃ 사이에서 5시간 이상 건조한 후 700~800℃에서 8시간 소성을 시킨다. 소성된 Ceramic-Zeolite를 다시 0.1 mm이하로 파쇄한 후 응집제 실험에 사용하였다. 본 제조 방법에 의하여 합성된 Ceramic-Zeolite의 물성 및 중금속 실험결과는 Table 2-2와 같다.

결과 및 고찰

2-1. 수질변화

시료를 채수한 시점의 물금 지역에 대한 이화학적 조사 (4회)를 실시한 결과, 대부분 오염정도가 높은 경향을 보였다. 수온은 평균 25.2℃, pH는 8.6의 분포를 보였고, BOD는 4.7~7.5 ㎎/L, NH^{+}_{4}-N는 0.07~0.51 ㎎/L범위를 보였는데 이는 1996년 7월부터 1997년 2월까지 조사한 BOD와 NH^{+}_{4}-N 농도인 2.6~10.1 ㎎/L와 0.02~0.75 ㎎/L보다는 다소 낮지만, 전반적으로 수질인자는 남조류의 번성에 영향을 받은 것으로 나타났다[37]. 그리고 엽록소 a 농도는 평균 87 ㎍/L로 부영양화 정도가 어느 정도 진행되었음을 보여 주었다. 또한 조류분포를 조사한 결과 우점종은 *M. aeruginosa*로 약 97%에 이르렀고, 그 외 *Anabena*, *Oscilliatoria* 등이 드물게 관찰되었다.

2-2. 무균분리 *M. aeruginosa*의 응집제에 의한 제거 효과

무균적으로 분리한 *M. aeruginosa*를 30℃, 40 μmol m^{-2} s^{-1}, 70 rpm 조건으로 전배양한 후에 CB 액체배지 (200 ㎖)에 약 7×10^{4} cell/㎖ 농도로 접종시킨 후 우선 Ceramic-Zeolite 응집제 4종을 0.15 및 1.5 ㎎/L 농도로 각각 첨가하여 1시간 및 24시간 후의 상층과 하층의 응집되지 않고 남아있는 세포수를 비교하였다 (Fig. 2-1). 0.15 ㎎/L

농도 주입 1시간 후에는 거의 변화가 없었으며, 24시간 후에도 급격한 감소는 일어나지 않아 0.15 ㎎/L 농도에서는 응집효과가 없는 것으로 나타났다. 그러나 10배 증가시킨 1.5 ㎎/L 농도에서는 세포가 응집제와 반응하여 침강하는 뚜렷한 변화가 나타났다 (Fig. 2-1). DCo 1:1의 상층 경우 1시간 및 24시간 후 모두 96.4%의 제거효율을 보여 1시간이면 어느 정도 제거효과를 볼 수 있는 것으로 나타났으나, 하층의 경우에는 22.2% 제거효율을 보여 효과가 없는 것으로 나타났다. DCo 3:7의 상층도 DCo 1:1과 같은 경향을 보였으나 DCo 1:1보다는 제거효율이 높았으며 (98.8% 제거효율), 저층의 경우는 24시간 후에는 세포수가 100%의 제거효율을 보였다. DCo 7:3의 상층은 1시간 후에는 95.2%, 24시간 후에는 96.4%의 제거효율을 보여 DCo 3:7보다는 제거효율이 낮으나, 저층의 경우 24시간 후에는 100% 제거되는 것으로 나타났다. 그리고 Co 100의 경우 상층에서는 1시간 후, 저층에서는 24시간 후에 세포수가 100% 제거되어 가장 효과가 있었다.

따라서 응집제에 의한 *M. aeruginosa*의 제거효과는 Co 100, DCo 3:7, DCo 7:3, DCo 1:1 순으로 나타났다. 이는 Co 100이 수중에서 Hydroxy apatite 즉 $Ca_5(PO_4)^3$를 방출하여 *M. aeruginosa*의 영양염 P 성분과 반응하여 적절하게 응집 제거하기 때문인 것으로 추측되며[48], 따라서 향후 Co 100 구성성분과 *M. aeruginosa* 제거 기작에 관

한 보다 구체적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되어진다.

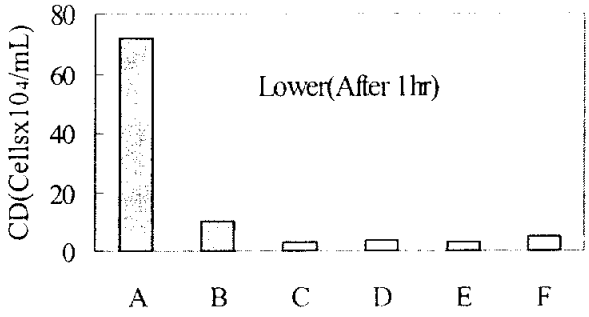
그리고 현재 바다 적조 제어에 가장 많이 사용하고 있는 황토를 무균적으로 분리한 *M. aeruginosa*를 전배양한 후에 CB 배지에 동일한 세포수로 접종시킨 후 각각 1, 10 ㎎/L 농도로 첨가하여 1시간 및 24시간 경과한 후의 세포수를 관찰한 결과 10 ㎎/L 농도에서도 제거효율이 낮아서 (상층, 하층의 경우 24시간 후에 각각 76.4, 70.7% 제거) 투입된 농도에 비해 제어효과는 Co 100 보다 적은 것으로 나타났다 (Fig. 2-1).

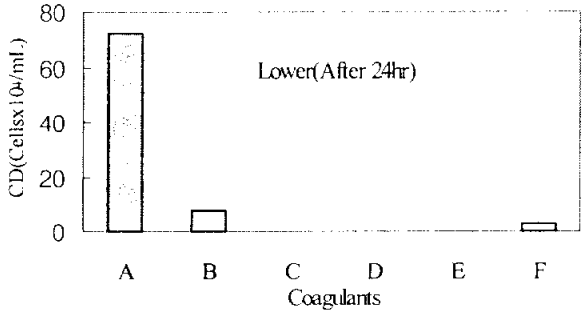
2-3. 현장채취 *M. aeruginosa*의 응집제에 의한 제거 효과

무균적으로 분리한 *M. aeruginosa*를 이용한 응집제 및 황토의 실내 실험결과를 근거로 하여 현장에 적용시켜 보았다. 1999년 7월 수화를 형성한 서낙동강 녹산 지점에서 3회 채수한 시료를 대상으로 실시하였는데, 이때의 조류 우점종은 *M. aeruginosa* (92%), *M. ichthyoblabe* (5%), *M. viridis* (3%)가 혼재해 있었다. 엽록소 a 농도는 각각 987 ㎍/L (1회), 584 ㎍/L (2회), 265 ㎍/L (3회)로 나타나 녹산 지점은 낙동강 본류인 물금보다 부영양화가 매우 심각함을 알 수 있었다.

실험방법과 응집제 주입 농도는 *M. aeruginosa* 실내 실험과 동일한 조건으로 실시하여 1시간 및 24시간 후에 *M. aeruginosa* 세포수를 측정하여 비교하였다. 실험결과 Fig. 2-2와 같이 Co 100이 현

장에서도 다른 응집제들 및 황토보다 제거율이 높아 실내실험 결과와 비슷한 경향을 보였다.


80
60
40
20
0
CD(Cellsx10⁴/mL)
Lower(After 1hr)
A
B
C
D
E
F


80
60
40
20
0
CD(Cellsx10⁴/mL)
Lower(After 24hr)
A
B
C
D
E
F
Coagulants

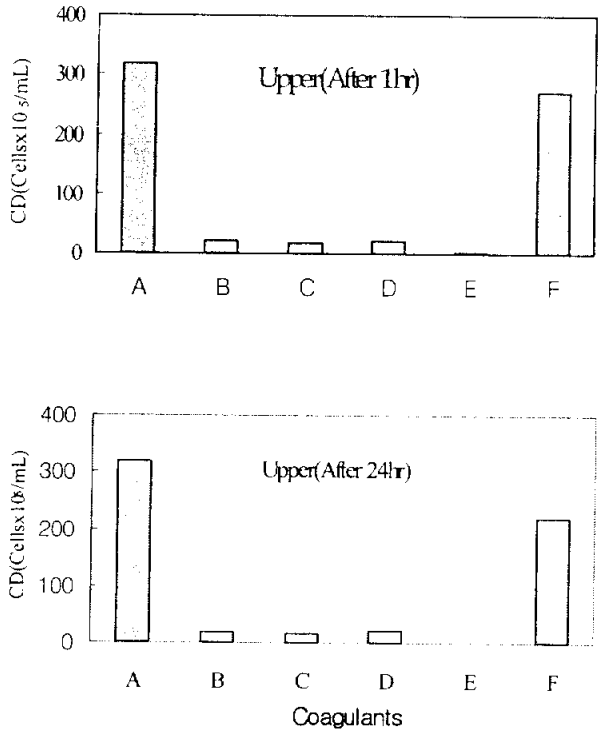
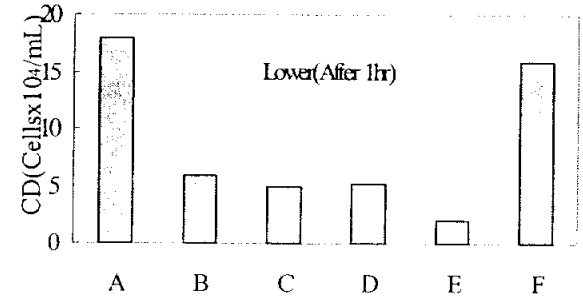
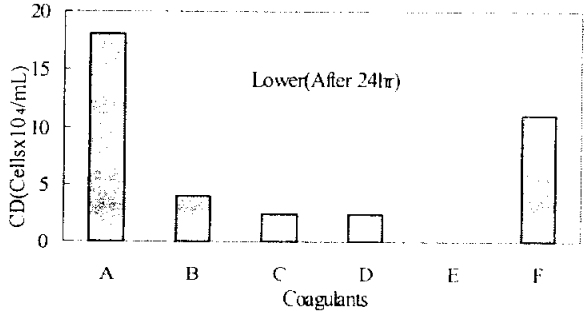


Fig. 2-1. Effect of Ceramic-Zeolite (1.5 ㎎/L) and Yellow loess (10 ㎎/L) on the removal of the axenic cultured *M. aeruginosa*. Ceramic-Zeolite (1.5 ㎎/L) and Yellow loess (10 ㎎/L) were added to 200㎖ of cell culture. Values are expressed as average from four measurements during March, 1998.

(A)Control, (B) DCo 1:1, (C) DCo 3:7, (D) DCo 7:3, (E) Co 100, (F) Yellow loess


CD(Cellsx10⁴/mL)
20
15
10
5
0
Lower(After 1hr)
A
B
C
D
E
F


CD(Cellsx10⁴/mL)
20
15
10
5
0
Lower(After 24hr)
A
B
C
D
E
F
Coagulants

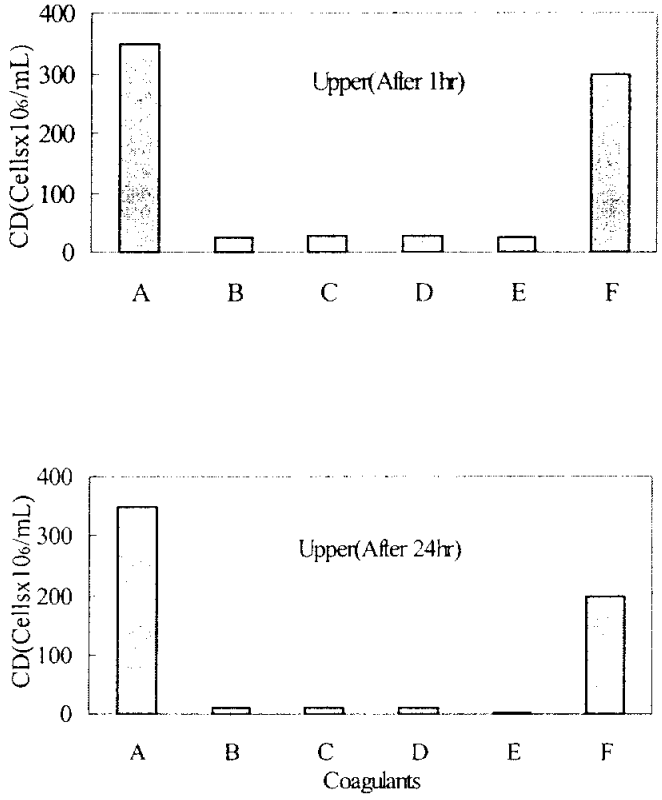


Fig. 2-2. Effect of Ceramic-Zeolite (1.5 ㎎/L) and Yellow loess (10 ㎎/L) on the removal of the field-collected *M.aeruginosa* were added to 200㎖ of water sample. Values are expressed as average from three measurements during July, 1999.

(A) Control, (B) DCo 1:1, (C) DCo 3:7, (D) DCo 7:3, (E)Co 100, (F) Yellow loess.

Table 2-1. Relative content (%) of elements in the coagulant Ceramic-Zeolite types.

Parameter	DCo 1:1	DCo 3:7	DCo 7:3	Co 100
O	56.71	58.00	58.78	73.88
Na	1.56	0.81	1.89	0.16
Mg	2.01	1.71	1.95	0.22
Al	4.85	3.51	4.85	0.15
Si	15.23	10.87	14.81	0.37
P	0.03	0.73	0.72	0.03
K	0.70	1.49	0.84	0.33
Ca	17.53	22.86	15.01	24.86
Ti	0.00	0.00	0.06	0.00
Fe	1.01	0.85	1.14	0.00

Table 2-2. Specification of Ceramic-Zeolite type.

Item	DCo 1:1	DCo 3:7	DCo 7:3	Co 100
Specfic gravity	2.37	2.48	2.41	2.50
As(㎎/L)	0.01	0.02	0.01	0.01
Pb(㎎/L)	0.2	0.2	0.1	0.1
Cd(㎎/L)	0.1	0.2	0.2	0.1
Cr(㎎/L)	0.3	0.7	0.5	0.2
Hg(㎎/L)	0.01	0.01	0.02	0.01

제 3 장

낙동강 하류 상수원수와 수돗물에서의 수인성 장관계 바이러스 분포조사

Abstract

We detected waterborne enteric viruses from the raw water and tap water in Busan metropolitan city by the total culturable virus assay of EPA standard method. According to the results of survey from July 2001 to November 2002, thirteen out of twenty one in raw water samples were positive (61.9%) for enteric viruses and all of the treated water and tap water samples were negative. The enteric viruses in raw water were mainly distributed through the summer to the early winter, suggesting the seasonal characteristics of virus distribution in water. The titer of enteric viruses per 100 liters of the raw water was ranged from 1.92 to 9.70 MPN by TCVA-MPN program. The isolated viruses were identified as either human poliovirus type I or enteroviruses by the immunofluorescent assay.

Key words : total culturable virus assay (TCVA), waterborne enteric viruses, poliovirus, enterovirus, immunofluorescent assay

서 론

장관계 (enteric viruses)바이러스는 인체의 소화관에서 증식하거나 이들을 경유하여 분변과 함께 체외로 방출되는 것들을 통틀어 일컫는다. 이들은 공통적으로 강산성 조건하에 매우 안정한 특징이 있어 사람의 위(胃)와 같이 생물이 서식하기 힘든 조건에서 견뎌내어 생존한다[62]. 이들 장관계 바이러스는 바이러스에 감염된 환자의 분변에서 많은 수 (분변 g당 10^8~10^{10} 입자)로 배출되어 하수를 거쳐 지표수·지하수 등 자연수계에 널리 분포한다[50]. 또한 어패류 등에 축적되어 사람이 섭취할 시 인체에 감염되어 다양한 수인성 질병의 원인이 될 수 있음이 보고되고 있다[57]. 현재까지 알려진 수인성 장관계 바이러스는 엔테로바이러스 (enteroviruses), 아데노바이러스 (adenoviruses), 레오바이러스 (reoviruses), 로타바이러스 (rotaviruses), A형 간염바이러스 (hepatitis A viruses) 등 110여 종류로 열성마비, 무균성 수막염, 호흡기 감염 등의 질병을 일으킬 수 있다 (Table 3-1)[61]. 수인성 장관계 바이러스는 환경에서 일반적인 세균보다 적은 농도로 분포하지만 생존력이 높고 염소처리에 대한 내성도 세균보다 강하며, 적은 수로도 감염이 가능하여 장관계 바이러스의 검출은 공중보건학적으로 매우 중요한 부분으로 인식되고 있다[54].

현재 환경 시료수에서 바이러스를 검출하기 위해 주로 사용하는 방법은 세포배양법이다. 전통적인 검출방법인 세포배양법은 농축된 시료를 세포에 감염시켜 세포병변 증상을 관찰하는 것으로써 감염성 있는 바이러스의 유무를 확인할 수 있는 유일한 방법이다. 장관계 바이러스의 대부분은 영장류 및 인간의 신장세포를 이용하여 임상 및 환경시료로부터 쉽게 분리가 가능하고, 이들 바이러스는 배양세포에 특이적인 세포병변효과 (cytopathic effect)를 일으키므로 쉽게 확인이 가능하다. 일반적으로 다수의 장관계 바이러스 감염이 가능한 원숭이 신장세포에서 유래한 BGM 혹은 Vero 세포주, 인간 세포주에서 유래한 Hela 세포주를 많이 이용한다[68]. 그러나, 이 방법은 시간이 많이 소요되고, 바이러스의 숙주 특이성으로 인하여 여러 종류의 세포를 이용하여야 하는 등 경제적인 부담이 드는 단점이 있다. 또한 바이러스 중 아데노바이러스 (adenoviruses), 아스트로바이러스 (astroviruses) 등은 BGM 세포와 같은 특정세포에 배양되지 않아 검출되지 않는 경우도 생긴다[53,54]. 이에 반해 분자생물학적 방법인 PCR (Polymerase Chain Reaction)법은 적은 양의 시료로도 검출이 가능하고, 바이러스 종류도 확인 할 수 있는 장점이 있다[53]. 그러나, 감염성 여부를 확인 할 수 없고 수중에 휴믹산 (humic acid)과 펄빅산 (fulvic acid)과 같은 유기물질이 존재하면 PCR에 사용되는 효소의 활성이 억제되어 검출감도가 저해되는 단점이 있다[51]. 최근에는 이들 방법의 한계를 극복하기 위한 ICC

(Integrate Cell Culture)-PCR에 대한 연구가 활발히 보고되고 있는 실정이나[53,60,61], 위양성의 가능성을 배제하는 동시에 배양세포에서 증식하지 않는 기타 감염성이 있는 수인성 바이러스를 검출할 수 없는 단점이 있으며 아직까지 ICR (Information Collection Rule)의 표준방법으로 확립되어 있지 않아 앞으로 이 방법의 취약점을 지속적으로 보완해야 하는 추가적인 검증이 이루어져야 할 것이다[59]. 최근 몇 년간 우리나라에서는 먹는 물에서의 바이러스 검출여부로 인해 크게 논란의 대상이 되고있다. 이러한 논란의 주된 이유는 국내적으로 통일된 바이러스 검출방법이 존재하지 않아 실험자들마다 사용한 검사방법이 달라 그 결과와 해석이 일치하지 않기 때문인 것으로 생각되어진다[55].

본 연구는 미국 EPA (Environment Protection Agency)와 환경부에서 규정하고 있는 표준검출법인 총세포배양법 (Total Culturable Virus Assay)으로 부산시 상수원수 및 수돗물을 대상으로 바이러스 검사를 실시하여 바이러스 검출과 동정 그리고 분포특성에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

3-1. 조사기간

상수원수에 대한 조사는 물금, 매리 및 회동 지점을 대상으로 2001년 7월에서 2002년 11월까지, 3개 정수장 (덕산, 화명, 명장) 계통별 조사는 정수 및 수도꼭지를 대상으로 2002년 1월부터 2002년 11월까지 실시하였다 (Fig. 3-1).

3-2. 이화학 및 미생물학적 조사

수온, pH 및 잔류염소는 각각 온도계, pH meter (Orion, Model 260) 및 잔류염소 측정기로 현장에서 즉시 측정하였으며, 탁도는 탁도계 (HACH, 2100N Turbidimeter)로 실험실에서 측정하였다. 생물학적 산소요구량 (BOD)은 시료를 5일 동안 20℃로 저장하여 Winkler 변법에 따라 적정하였다[52]. Chl-a 농도는 500 ㎖의 시료를 0.45 μm filter로 여과시킨 후 90% acetone 용액에서 24시간 chlorophyll을 추출하였다. 이때 chlorophyll의 안정화를 위하여 포화 $MgCO_3$용액으로 세척하였다. 추출된 용액을 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 각각 750, 664, 647, 630 nm에서의 흡광도를 측정하여 trichromatic method의 계산식에 따라 측정하였다[52].

총대장균군 (Total coliforms) 및 대장균 (E.coli) 실험은 막여과법

을 이용하여 실시하였다[63]. 시료 100 ㎖를 0.45 ㎛ filter로 여과시킨 후 m-Endo LES 한천배지에 옮겨 35℃ 배양기에서 1~2일 배양한 후 총대장균군 검출여부를 확인한 후 여지를 NA (Nutrient Agar)-MUG 배지에 다시 옮겨 35℃ 배양기에서 4시간 배양한 후 자외선 형광램프 (366 nm)하에서 대장균 유무를 확인하였다. 빈영양 종속영양세균 (HPC : Heterotropic Plate Count)은 R_2A agar (Difco 사) 평판배지에 시료 1 ㎖를 도말한 후 25℃ 배양기에서 14일간 배양하여 형성된 colony를 계수하였다[64].

3-3. 바이러스 및 세포주

CPE 양성 대조군으로 사용한 바이러스는 약독화된 poliovirus type Ⅲ를 사용하였다[18]. 사용한 세포주는 미국 ATCC에서 분양받은 BGM (Buffalo Green Monkey kidney) 세포이다. BGM 세포주의 배양액은 항생제와 10% FBS가 첨가된 MEM/L-15 배지를 사용하였다. 세포의 계대는 우선 monolayer가 형성된 BGM 세포주를 CO_2 배양기에서 꺼내어 배양용기 안에 있는 배지를 우선 제거한 후 trypsin-EDTA를 세포배양용기에 적정량 (약 10 ㎖)을 넣고 37℃ 배양기에 5분 정도 방치하였다. BGM 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 세포배양플라스크에 분

주하여 37℃ 배양기에서 배양하였다.

3-4. 시료 채수 및 여과

시료채수 여과장비는 미국 EPA의 ICR 및 환경부에서 권장하는 표준필터장치를 조합하여 사용하였다[38,69]. 원수와 수도꼭지에 대한 시료 채수는 1-MDS filter (Cuno사)를 이용하여 여과하였는데 본 실험에 사용된 filter는 수중에서 negative charge를 띄고 있는 바이러스를 포함한 수중의 모든 유기물질을 흡착할 수 있도록 제조된 것으로 표면자체가 positive charge이다. 원수는 최소 200 L, 정수 및 수도꼭지는 1,200 L 이상을 여과하였다.

3-5. 탈리 및 유기응집농축

채수한 시료의 전처리는 미국 EPA의 ICR 방법에 준하여 수행하였다[56]. 1-MDS 여과지가 장착된 여과기 (cartridge housing module)의 관내로 1,000 ㎖의 50 mM glycine이 함유된 1.5% beef extracts (pH 9.5)를 부은 후 용출액의 거품발생을 최대한 줄일 수 있도록 천천히 압력을 가해 3회 반복하여 용출시켰다. 탈리된 용출액은 유기응집법을 이용하여 농축시켰는데 우선 pH를 7.0으로 조정한 후 1 M HCl로 3.5±0.1로 조절하여 실온에서 30분간 천천히 교반시켜 침전물 생성여부를 확인하였다. 탈리액을 2,500 ×g에서 4℃로 15분간 원심분리 하고 상등액을 제거한 후 0.15 M PBS (phosphate buffered

saline, pH 9.4) 30 ㎖를 첨가한 후 완전히 용해시켰다. 용해된 침전물을 7,000 ×g, 4℃에서 10분간 원심분리 한 후, 상등액만 취하여 1 M HCl로 pH를 7.0~7.5로 조정하였다. 미생물 오염을 제거하기 위해 50 ㎖ 주사기에 상등액을 넣어 pH 7.5의 beef extract 용액을 통과시킨 0.22 ㎛ 멸균 필터를 이용하여 여과하였다.

3-6. 세포배양 및 정량

여과시킨 상등액을 3~6일간 배양된 BGM 세포주에 접종하였다. 접종량은 바닥 면적당 (㎠) 0.04 ㎖가 넘지 않게 조절하여 결정하였다. 음성대조구는 pH 7.4의 0.15 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 용액에, 양성대조구는 순화된 poliovirus type Ⅲ를 0.15 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 7.4) 용액으로 희석하여 시료 접종량과 동일하게 접종하였다. 바이러스 흡착을 위해 80~120분간 CO_2 배양기에 정치시키고, 15~20분 간격으로 흔들어 주었다. 세포 배양플라스크에 2% FBS가 함유된 MEM/L-15 배지를 적절하게 분주한 후 37℃, CO_2 배양기에 배양하면서 14일간 CPE (Cytopathic Effect)를 관찰하였다. 검출된 바이러스의 정량은 양성과 음성시료의 결과를 기록지에 기입한 후 US EPA에서 공급한 MPN program을 사용하여 결과를 분석하였으며, 원수는 100 L, 수돗물은 1,000 L를 기준으로 환산하였다.

3-7. 바이러스 정량

바이러스 감염 24시간 전에 원숭이 신장세포 (BGM cell)를 1×10^6cells /6 well dish 되도록 분주한 뒤 10% FBS가 들어있는 DMEM 배지를 첨가하여 세포가 배양접시 표면에 차도록 키웠다. 위에서 수거한 배지 상등액 400 ㎕를 넣고 1시간 감염시킨 후 2% CMC 배지와 1% FBS가 함유된 DMEM 배지를 첨가하여 바이러스 감염을 진행시켰다. 3일간 배양한 후에 crystal-violet 염색을 실시하여 생성된 plaque의 개수를 세어 ㎖당 바이러스의 수를 계산하였으며 실험은 3회 실시하였다.

3-8. 면역형광 분석

2차 세포배양에서 CPE가 확인된 바이러스의 동정을 위해 간접적인 면역형광법으로 분석하였다[73]. 먼저 CPE가 확인된 monolayer의 세포를 trypsin으로 떼어내어 그 cell을 PBS로 부유시켰다. 실온에서 250×g, 10분간 원심분리 한 후 cell pellet을 0.2 ㎖의 PBS로 현탁하여 슬라이드에 cell spot (약 2×10^4 cell/㎖)을 만들고 공기중에서 완전하게 건조시켰다. 건조가 다 되면 2~8℃의 acetone으로 10분간 슬라이드를 고정시켰다. 고정 후 형광염색은 슬라이드를 상온에 두고 탐지하고자 하는 바이러스에 대한 mouse monoclonal antibody (CHEMICON Cat. No. 3303, 3311, 3321, 3336, 3360)를 cell spot에

접종하여 습기가 충분한 chamber에 슬라이드를 넣고 37℃, 30분간 배양을 하였다. monoclonal antibody를 제거하고 PBS로 10~15초 동안 조심스럽게 씻은 후 anti-mouse IgG/FITC (Light Diagnostics Catalog No. 5013)를 접종하였다. 다시 동일하게 습기가 충분한 chamber내에 슬라이드를 넣고 37℃, 30분간 배양하고 수용성 mounting media (pH 8.5)를 사용하여 커버슬립을 덮은 후 형광 현미경 검경시 100~200× 배율로 FITC의 apple-green 색의 형광을 검사하고 400× 배율로 확인 검경하였다.

결과 및 고찰

3-1. 물리 · 화학적 수질특성

2001년 7월부터 2002년 11월까지 조사한 시료들의 물리 · 화학적 및 미생물학적 실험결과를 Table 3-2와 3-3에 요약하였다. 먼저 수온은 생물의 활성을 지배하는 중요한 환경요인으로 미생물의 영양요구성 정도를 변화시킬 뿐만 아니라 세포내의 생화학적 반응을 결정하기도 한다. 조사기간중 상수원수의 경우 수온의 변화는 7월부터 9월까지는 22℃ 이상의 수온을 유지하였고, 10월부터 11월 사이에는 점차 감소를 보였으며 12월에서 2월까지는 10℃ 이하로 떨어져 계절적 특성을 잘 보여 주었다. 수중의 화학적 · 생물학적 변화에 대한 중요한 오염지표 항목인 pH는 바이러스 채수시 주요한 인자인데 특히 2001년 하절기 및 동절기에는 대체로 8.5 이상의 높은 수치를 보여 0.1 M HCl로 pH 값을 7.0 내외로 유지하며 채수를 실시하였다. 이 시기에 pH 수치가 높은 이유는 하계의 *Microcystis aeruginosa*, 동계의 *Stephanodiscus hantzschii*에 의한 식물플랑크톤 등이 대량 증식하였기 때문인 것으로 생각되어진다[37]. 탁도의 경우 원수는 3.5~25.7 NTU로 비교적 높은 분포를 보였으나, 정수 및 수도꼭지에서 나오는 물의 경우 대부분 0.1 NTU 이하로 나타나 미국 EPA에서 권장하고 있는 기준이하로 처리되고 있는 것으로 나타났다. 수질오염의 대표적인 오염지표인 BOD와 Chl-a의 경우 각각 0.8~4.1 ㎎/L,

7.2~185.9 ㎎/㎥ 범위를 보였는데 주로 하절기 보다 동절기 시기의 수치가 대체로 높은 경향을 보였다. 상수원수의 수질은 Chl-a 항목을 OECD의 영양화 기준으로 평가할 때 이미 부영양화상태에서 과영양화 상태로 전이한 것으로 보여진다[51]. 정수 및 수도꼭지에서의 잔류염소는 0.2~0.8 ㎎/L로 수질기준(0.2 ㎎/L 이상)에 모두 적합한 것으로 나타났다.

3-2. 미생물학적 수질특성

상수원수에서 병원성 미생물의 존재는 언제나 공중위생에 있어 큰 관심사가 되고 있다. 따라서 미생물학적 감시는 채수 시점에서 채취된 시료의 수인성 질병을 일으키는 감염체의 전염에 대하여 수원보호, 수처리, 급수 등이 어느 정도 효과적인 제어기능을 하는지에 대한 지표역할을 한다[72]. 지표성 미생물 항목인 총대장균군과 대장균 실험결과는 상수원수의 경우 총대장균군은 10~8100 MPN/100㎖, 대장균은 0~300 MPN/100㎖ 범위를 보였다. 이는 동일한 방법으로 국립환경연구원이 일부지역 상수원수를 대상으로 조사한 총대장균군 10~5300 MPN/100㎖, 대장균 0~700 MPN/100㎖ 결과와 비교하였을 때 총대장균군 수치는 높게, 대장균 수치는 낮은 분포를 보였다[60]. 실험결과 탁도가 높은 경우에 지표성 미생물 오염농도가 높아 탁도와 지표성 미생물 항목은 바이러스 검출 분포와 어느 정도 상관관계가 있는 것으로 보여지기 때문에 이에 대한 정

확한 조사가 이루어져야 할 것으로 판단되어진다. 소독을 포함한 정수처리공정의 효율을 확인하는 항목으로 사용되고 있는 HPC (Heterotropic Plate Count)는 원수에서 $1.6\times10^{3}\sim8.5\times10^{4}$ CFU/㎖로 나타났는데 이 수치는 1997년도에 측정된 물금 지점의 $2.8\times10^{4}\sim6.5\times10^{5}$ CFU/㎖ 보다는 적게, 1996년도에 조사된 서울시 상수원수의 $3.0\times10^{2}\sim2.7\times10^{5}$ CFU/㎖와는 비슷한 결과를 보였다[37,71]. 그리고, 정수 및 수도꼭지 시료에서는 모두 검출되지 않았는데 이는 정수과정에서 미생물이 완전하게 제거된 것으로 보여진다. 조사된 측정항목의 결과를 토대로 종합해보면 3개 지점의 상수원수는 유기물과 미생물 오염수치가 높게 나타났으며, 특히 수온이 떨어지는 겨울철이 여름철 보다 오염정도가 높은 것으로 나타나 갈수기가 지속되는 겨울철에 보다 철저한 원수에 대한 수질관리 방안과 정수처리 대책이 요구되어진다.

3-3. 바이러스 검출 및 분포특성

총세포배양법에 의한 상수원수에 대한 바이러스 검사는 총 21회, 정수 및 수도꼭지수의 바이러스 검사는 총 24회에 걸쳐 실시하였다. ICR 방법에 따라 200~1200 L 시료를 오염정도에 따라 25~30 ㎖ 정도로 최종 농축하여 실험에 사용하였다. 바이러스 검출을 위한 세포의 관찰은 도립현미경을 사용하였으며, CPE 현상이 일어나는지를 확인하기 위해 첫 3일간은 매일, 그 다음은 이틀 간격으로 관찰하였

다. 배지는 미리 36.5℃로 유지하여 4~7일마다 갈아주었다. 1, 2차 검사에서 양성을 보인 시료는 양성으로 판정하고 1차 음성, 2차 양성인 경우는 3차 검사를 시행하여 바이러스 검출여부를 확인하였다. 그 결과 총 21개의 원수 시료 중 13개 시료에서 CPE가 확인 (Fig. 3-2)되어 61.9%의 양성율을 보였다. 검출된 13개 시료를 지점별로 살펴보면 물금 3회, 매리 4회 및 회동 6회로써, 회동 원수가 물금·매리 원수보다 검출율이 높았는데 이는 검출된 시기에 상대적으로 높은 원수의 탁도와 밀접한 상관성이 있는 것으로 생각되어진다. 총 세포배양법에 의해 검출된 바이러스는 미국 EPA에서 공급한 MPN program을 사용하여 측정하였는데 1.92~9.70 MPN/100 L로 정량되었다. 이 수치는 서울시에서 1999년 4월에서 2000년 3월 동안 조사한 1.02~3.23 MPN/100 L, 이 등이 조사 (1997. 9~1998. 7)한 2.0×10^{-3}~2.9×10^{-2} MPN/L 보다 높은 것으로 나타나 부산시 상수원수는 서울시 상수원수에 비해 바이러스 등의 수인성 오염이 상대적으로 높음을 알 수 있었다[62,67]. 또한, 계절별로 볼 때 1~3월에 2회, 4~6월에 2회, 7~9월에 4회, 10~12월에 5회로 나타나 여름철부터 초겨울에 주로 분포하는 특성을 보여주었는데 (Fig. 3-3), 이는 Tani 등이 1991년 일본 Safo강 지점을 대상으로 조사한 결과와 분포 특성이 거의 일치하였다[66]. 정수 및 수도꼭지수 24개의 시료에서는 검사결과 모두 바이러스가 검출되지 않았는데, 이는 3개 정수장의 정수처리공정에서 감염성 바이러스를 적절하게 제거하여 불활성화

시킨 것으로 보여진다.

총세포배양법에 의해 정수 및 수도꼭지수에서 바이러스가 검출되지 않았지만 수돗물의 안전성을 확신하기 위해서는 앞으로 관말을 비롯한 넓은 범위의 많은 수도꼭지 시료에 대해 바이러스 오염여부를 확인하고, 검출하고자 하는 바이러스의 영역을 확대함은 물론 정수처리공정에서 바이러스를 효과적으로 제거할 수 있는 소독제에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다[62,72]. 또한 환경시료 중에 매우 낮은 농도로 존재하고 있는 레오바이러스 (reoviruses), 아스트로바이러스 (astroviruses) 등은 표준시험방법에 규정되어 사용하고 있는 BGM 세포에서는 증식하지 못해 CPE 현상을 관찰하기 어렵기 때문에 검출하고자 하는 다양한 바이러스를 정확히 탐지하기 위해서는 표준시험방법에 바이러스 종류에 따른 세포주의 선정 및 선택에 대해서도 추가적으로 고려해야 할 것으로 생각되어진다[51,60]. 그리고 환경시료에 존재하는 이러한 수인성 장관계 바이러스의 검출은 국민 보건학적 관점에서 보면 아주 중요하기 때문에 검출시간이 단축되고 검출 민감도가 높은 ICC-PCR 방법에 대해서도 바이러스 표준시험방법으로 추가하여 검증해야 할 것으로 생각된다[60,61].

3-4. 바이러스 동정

총세포배양법에 의해 상수원수 중에서 검출된 바이러스는 면역형

광시험법을 이용하여 동정하였다 (Table 3-4, Fig. 3-4). 분리된 13개 바이러스 중 8개는 human poliovirus type I 과 enterovirus로 확인되었으나, 5개의 시료는 사용된 항체에서는 동정되지 않았다. 이는 서울시 상수원수를 대상으로 서울시에서 동정된 coxsackie B, poliovirus[62], PCR 산물을 sequencing하여 동정한 adenovirus, enterovirus[70], 그리고 부산시 상수원수를 대상으로 PCR을 이용하여 동정한 human poliovirus type I 과 비슷한 경향을 보이는 것으로 나타났다[58].

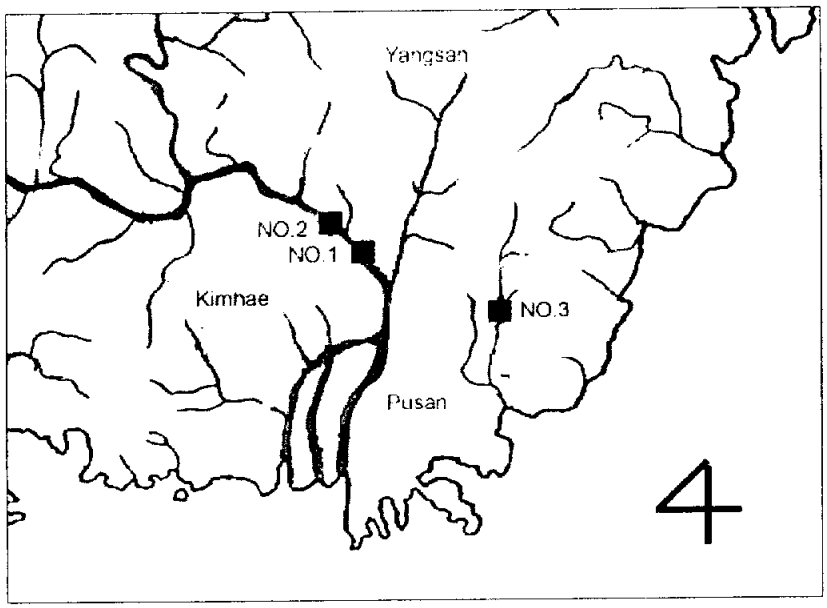


Fig. 3-1. Sampling sites for surveying of viruses in Nakdong river.

(No.1 site : Maeri, No.2 site : Mulgum, No.3 site : Heidong)

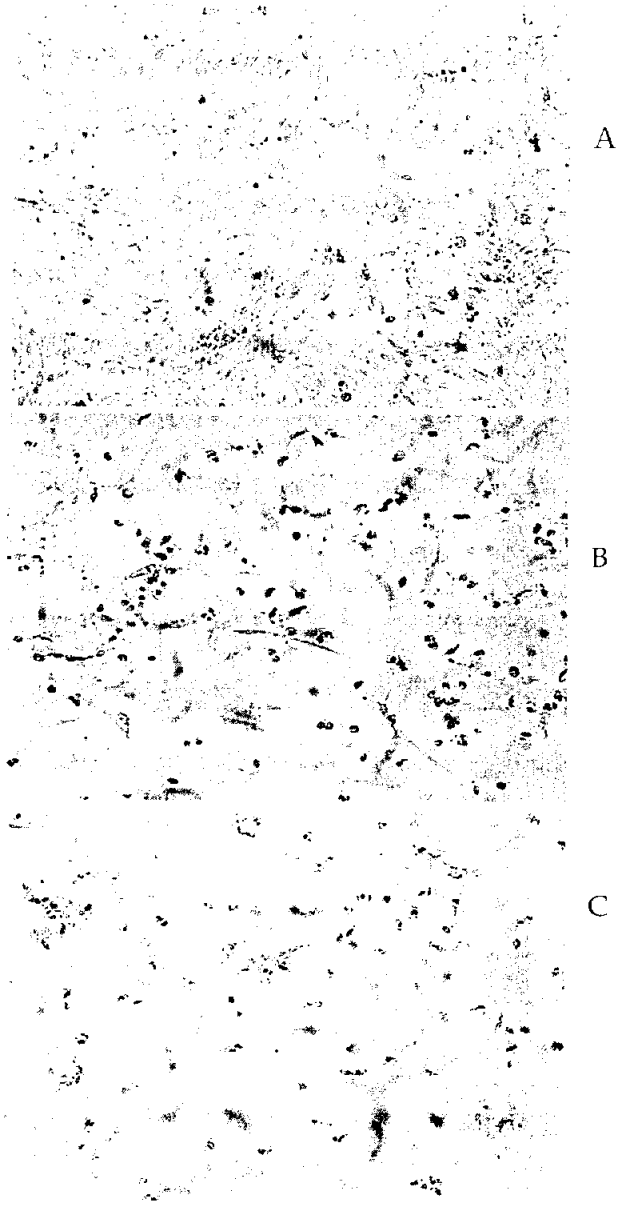


Fig. 3-2. Cytopathic effect in BGM cells.

A : Control, B : Poliovirus (Sample number 1, No.1 site),

C : Enterovirus (Sample number 17, No.2 site)

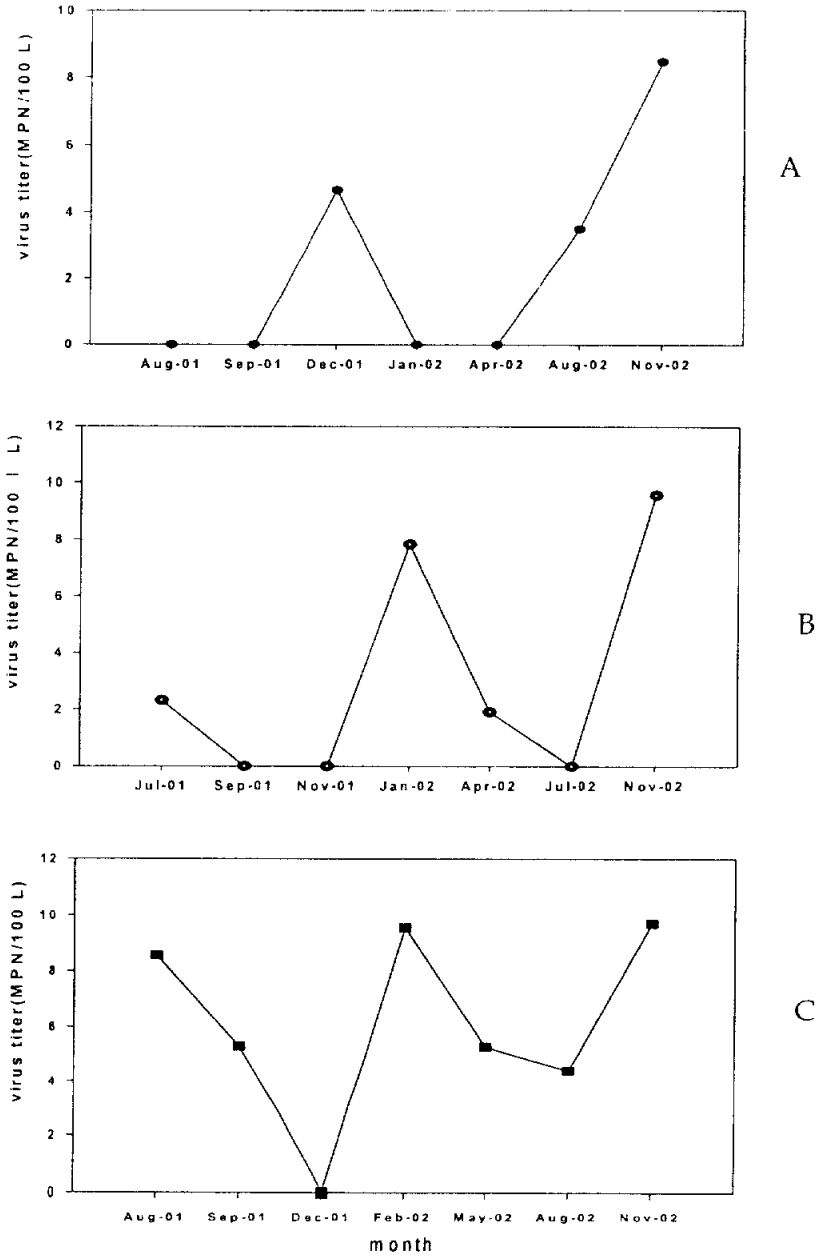


Fig. 3-3. Enteric viruses distribution of seasonal and sampling station in raw water.
(A : Mulgum, B : Maeri, C : Heidong)

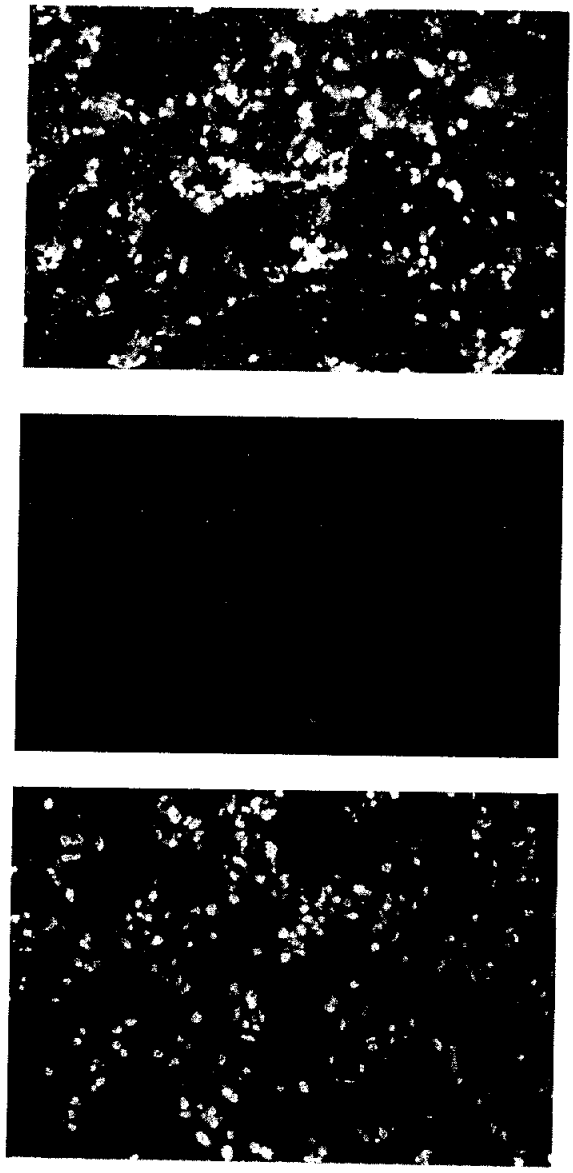


Fig. 3-4. **Identification of enteric virus in raw water by immunofluorescent test.**
A : Control, B : Enterovirus (Sample number 17, No.2 site) , C : Poliovirus (Sample number 1, No.1 site)

Table 3-1. Clinical syndromes associated infections by Enteric viruses.

	Viruses	Clinical syndromes
Entero viruses	Polioviruses types 1~4	Paralysis, Aseptic meningitis, Undifferentated febrile illness
	Coxsakieviruses group A types 1~24	Herpingina, Paralysis, Aseptic meningitis, Exanthema, Hepatitis, Acute hemorrhagic conjunctivitis, Cold
	Coxsakieviruses group B types 1~6	Pleurodynia, Aseptic meningitis, Paralysis, Rash, Pericarditis, Myocarditis, Pneumonia, Positive fatigue syndrome
	Echoviruses types 1~34	Aseptic meningitis, Pleurodynia, Respiratory disease Diarrhea
	Enterovirus types 68~71	Pneumonia, Bronchiolotis, Paralysis, Meningoencephalitis
Adenovirus types 1~41		Conjunctivitis, Respiratory disease
Hepatitis A virus		Acute hepatitis, Fever, Jaundice
Rotavirus types 1~4		Gastroenteric disorder of infant, Vomiting
Norwalkvirus		Gastroenteric disorder
Astrovirus types 1~4		Gastroenteric disorder
Calcivirus		Gastroenteric disorder

Table 3-2. Water quality in raw water from July 2001 to December 2001.

Sample number	Sampling sites	Sampling time (day/mo/yr)	pH	Temp. (℃)	Tur. (NTU)	BOD (㎎/L)	Chl-a (㎎/㎥)
1	No.1	30/07/2001	8.5	30.7	12.6	2.7	33.8
2	No.3	14/08/2001	8.9	23.0	25.7	2.3	78.5
3	No.2	18/08/2001	8.2	29.4	18.7	2.4	61.5
4	No.2	25/09/2001	9.0	23.1	13.7	2.9	83.2
5	No.1	26/09/2001	9.4	23.0	11.4	3.0	81.2
6	No.3	28/09/2001	6.9	23.0	3.5	1.2	54.7
7	No.1	29/11/2001	9.4	9.5	9.7	4.1	133.3
8	No.3	20/12/2001	8.8	6.3	11.6	3.0	15.5
9	No.2	21/12/2001	9.5	3.3	10.5	4.1	185.9

(Continue)

Sample number	Sampling sites	Sampling time (day/mo/yr)	Total coliforms (MPN/ 100mL)	E.coli (MPN/ 100mL)	HPC (CFU/mL)
1	No.1	30/07/2001	1800	3	52500
2	No.3	14/08/2001	2500	5	15600
3	No.2	18/08/2001	2100	ND	76400
4	No.2	25/09/2001	690	ND	3000
5	No.1	26/09/2001	690	ND	36500
6	No.3	28/09/2001	460	ND	4700
7	No.1	29/11/2001	400	ND	9800
8	No.3	20/12/2001	330	ND	7000
9	No.2	21/12/2001	460	ND	23000

※ No.1 site = Maeri, No.2 site = Mulgum, No.3 site = Heidong

Table 3-3. Water quality in water treatment plants from January 2002 to November 2002.

Sample number (Sampling sites)		Sampling time (day/mo/yr)	pH	Temp. (℃)	Tur. (NTU)	Residual Chlorine (mg/L)	BOD (mg/L)	Chl-a (mg/m³)
10 (No.1)	RW	15/01/2002	8.4	4.0	7.6	-	2.9	78.7
	TW	15/01/2002	7.1	5.0	0.09	0.5	-	-
	TW-1	15/01/2002	7.3	6.0	0.10	0.6	-	-
11 (No.2)	RW	21/01/2002	7.7	2.5	18.1	-	3.2	69.1
	TW	21/01/2002	6.9	6.4	0.09	0.8	-	-
	TW-1	21/01/2002	7.0	5.0	0.09	0.6	-	-
12 (No.3)	RW	01/02/2002	7.2	6.0	3.4	-	1.5	6.1
	TW	01/02/2002	6.9	6.0	0.09	0.6	-	-
	TW-1	01/02/2002	6.8	6.0	0.11	0.4	-	-
13 (No.1)	RW	18/04/2002	7.7	17.2	10.6	-	2.8	10.9
	TW	18/04/2002	6.9	17.3	0.10	0.8	-	-
	TW-1	18/04/2002	6.9	17.5	0.11	0.3	-	-
14 (No.2)	RW	25/04/2002	7.9	17.0	12.2	-	2.1	20.1
	TW	25/04/2002	6.7	17.2	0.09	0.6	-	-
	TW-1	25/04/2002	6.9	18.8	0.09	0.4	-	-
15 (No.3)	RW	02/05/2002	7.1	15.0	2.6	-	1.2	12.0
	TW	02/05/2002	6.7	15.2	0.08	0.6	-	-
	TW-1	02/05/2002	7.0	15.3	0.12	0.2	-	-
16 (No.1)	RW	10/07/2002	7.3	23.0	8.9	-	2.2	42.1
	TW	10/07/2002	6.7	23.1	0.11	0.7	-	-
	TW-1	10/07/2002	6.7	26.2	0.11	0.4	-	-
17 (No.2)	RW	20/08/2002	7.8	23.0	20.3	-	1.2	34.3
	TW	20/08/2002	6.8	24.0	0.09	0.7	-	-
	TW-1	20/08/2002	6.9	24.5	0.09	0.6	-	-
18 (No.3)	RW	22/08/2002	7.2	22.0	7.3	-	0.8	7.2
	TW	22/08/2002	6.9	22.2	0.08	0.7	-	-
	TW-1	22/08/2002	6.9	23.1	0.11	0.2	-	-
19 (No.2)	RW	04/11/2002	7.4	12.5	8.2	-	2.9	58.9
	TW	04/11/2002	6.9	12.5	0.11	0.8	-	-
	TW-1	04/11/2002	6.9	13.5	0.12	0.2	-	-
20 (No.1)	RW	21/11/2002	7.4	11.0	9.5	-	2.9	73.6
	TW	21/11/2002	6.7	11.5	0.08	0.7	-	-
	TW-1	21/11/2002	6.9	11.5	0.10	0.4	-	-
21 (No.3)	RW	26/11/2002	8.0	9.5	10.1	-	1.3	10.1
	TW	26/11/2002	7.2	10.2	0.11	0.6	-	-
	TW-1	26/11/2002	7.2	10.2	0.11	0.5	-	-

(Cotinue)

Sample number (Sampling sites)		Sampling time (day/mo/yr)	Total coliforms (MPN/ 100mL)	E.coli (MPN/ 100mL)	HPC (CFU/mL)
10 (No.1)	RW	15/01/2002	10	ND	15000
	TW	15/01/2002	ND	ND	ND
	TW-1	15/01/2002	ND	ND	ND
11 (No.2)	RW	21/01/2002	200	ND	34000
	TW	21/01/2002	ND	ND	ND
	TW-1	21/01/2002	ND	ND	ND
12 (No.3)	RW	01/02/2002	17	ND	1600
	TW	01/02/2002	ND	ND	ND
	TW-1	01/02/2002	ND	ND	ND
13 (No.1)	RW	18/04/2002	2400	3	21000
	TW	18/04/2002	ND	ND	ND
	TW-1	18/04/2002	ND	ND	ND
14 (No.2)	RW	25/04/2002	700	ND	25000
	TW	25/04/2002	ND	ND	ND
	TW-1	25/04/2002	ND	ND	ND
15 (No.3)	RW	02/05/2002	430	8	5600
	TW	02/05/2002	ND	ND	ND
	TW-1	02/05/2002	ND	ND	ND
16 (No.1)	RW	10/07/2002	8100	300	19800
	TW	10/07/2002	ND	ND	ND
	TW-1	10/07/2002	ND	ND	ND
17 (No.2)	RW	20/08/2002	450	ND	34000
	TW	20/08/2002	ND	ND	ND
	TW-1	20/08/2002	ND	ND	ND
18 (No.3)	RW	22/08/2002	120	ND	10300
	TW	22/08/2002	ND	ND	ND
	TW-1	22/08/2002	ND	ND	ND
19 (No.2)	RW	04/11/2002	430	4	84700
	TW	04/11/2002	ND	ND	ND
	TW-1	04/11/2002	ND	ND	ND
20 (No.1)	RW	21/11/2002	390	10	39200
	TW	21/11/2002	ND	ND	ND
	TW-1	21/11/2002	ND	ND	ND
21 (No.3)	RW	26/11/2002	170	2	11000
	TW	26/11/2002	ND	ND	ND
	TW-1	26/11/2002	ND	ND	ND

※ No.1 site = Maeri, No.2 site = Mulgum, No.3 site = Heidong
※ RW = Raw water, TW = Treated water, TW-1 = Tap water
※ HPC = Heterotropic Plate Count
※ ND = Not Detected

Table 3-4. Identification of enteric viruses in raw water from July 2001 to November 2002.

Sample Number	Sampling sites	Identification
1	No. 1	Poliovirus type I
2	No. 3	Poliovirus type I
8	No. 3	Poliovirus type I
9	No. 2	Enterovirus
10	No. 1	Enterovirus
12	No. 3	Enterovirus
17	No. 2	Enterovirus
18	No. 3	Enterovirus

※ No.1 site = Maeri, No. 2 site = Mulgum, No. 3 site = Heidong

제 4 장

낙동강 하류 상수원수의 생물활성탄 정수처리공정 및 오존에 의한 수질변화와 폴리오바이러스 제거

Abstract

Water quality and removal of polio virus have been determined in a pilot plant using biological activated carbon (BAC) during water treatment process at the downstream of the Nakdong River. Most of water quality parameters were highly improved after passing through the BAC. Predominant bacterial species grown in BAC were identified as *Pseudomonas, Flavobacterium, Alcaligenes, Acinetobacter* and *Aeromonas* species. For the removal efficiency of the poliovirus type Ⅲ, 99.6% of virus was removed by pre-ozonation, sedimentation and sand filteration 100% of virus was after in BAC filteration step. In the survey of virus removal efficiency by ozone, approximately 61.1% of poliovirus

was inactivated by ozone of 0.4 ㎎/L within 5 min, and 100% of polio virus was inactivated by ozone of 0.8 ㎎/L over 10 min.

Key words : Biological Activated Carbon(BAC), cell culture, Integrated cell culture - Polymerase chain reaction(ICC-PCR), poliovirus, ozone

서 론

정수처리의 가장 중요한 목적 중 하나는 시민들을 먹는 물에서 병원성 미생물의 위험으로부터 보호하는 것이다. 현재 정수처리에서 수인성 미생물에 대한 관심은 콜레라 (Cholera), 장티푸스 (Typhid) 등과 같은 세균과 바이러스 (Virus), 지아르디아 (Giardia) 그리고 크립토스포리디움 (Cryptosporidium) 등이 포함되고 있다[74]. 이러한 병원성 미생물 중 현재 국내에서 가장 문제가 되고있는 것은 장관계 바이러스 (Enteric virus)이다. 바이러스는 살아있는 숙주세포에서만 자기복제와 증식이 가능한 필연적 세포내 기생체이다. 일단 세포 밖으로 방출되면 개개의 바이러스 입자 (Virion)는 새로운 숙주에 침투할 때까지 복제나 증식을 비롯한 물질대사를 수행하지 않는 상태로 존재하며 동물바이러스 중 많은 종류가 한정된 기간 내에 새로운 숙주를 찾지 못할 경우에는 다양한 환경적 요인에 의하여 불활성화 되는 것이 일반적이다[12].

수인성 장관계 바이러스는 110여 종류가 알려져 있으며 먹는 물의 수원에 분포할 경우 최소 감염 단위가 낮기 때문에 1~2MPN/100 L 정도의 소량으로도 감염되어 설사, 무균성 뇌수막염, 심근염 등의 급성질환을 일으킬 수 있다. 이러한 장관계 바이러스는 정수장에서 소독이나 여과와 같은 정수처리공정에서 제거가 가능하

나 세균에 비해 소독제에 대한 내성이 강한 생태학적 특성을 지녀 바이러스가 지표세균이 검출되지 않은 경우에도 검출될 가능성이 높다 하겠다. 소독 처리시에 이러한 지표세균의 한계적인 특성을 감안하여 처리수의 지표세균을 검사하여 처리능을 판정하지 않고 가장 내성이 강한 종류의 미생물을 처리할 수 있는 강도의 소독처리를 수행하도록 하여야 한다. 현재 국내 정수장에서 소독능 평가는 CT (소독제 농도×접촉시간)의 식으로 표현되며, 물 속의 미생물 농도는 CT 값에 비례하여 지수 함수적으로 감소하는 특성을 나타낸다. 이러한 CT 값은 정수장에서 사용되는 소독제의 종류, 수온, pH 등에 영향을 받으며, 정수장에서 달성하여야 하는 필요 소독능의 기본개념이 된다[76].

그러나 국내에서는 일부 미생물 (일반세균, 총대장균군)에 대한 기준만 존재할 뿐 바이러스에 대한 수돗물 수질기준은 우리나라를 비롯하여 대부분의 나라에서 설정하고 있지 않으나, 미국 EPA (Environmental Protection Agency)의 지표수 처리법 (Surface Water Treatment Rule)에서는 지표수 또는 지하수의 영향을 받은 수돗물에 대해 MCL (Maximum Contamination Level)로써 기술적으로 오염물질의 농도를 확인하기 어려운 경우에 적용하는 처리기술규정 (Treatment Technique)을 정해 장관계 바이러스를 정수처리 과정시 99.99% (4-logs) 제거, MCLG (Maximum Contamination Level Goal)는 "불검출" 또는 "0"으로 정해 물 환경에서의 바이러스

의 위해성과 그에 따른 제어의 필요성을 강조하고 있다[76].

바이러스는 정수처리공정을 거친 처리수의 경우에 응집·침전·여과·소독 처리에 의해 제어되어지게 되는데 박테리아에 비하여 염소에 대한 저항성이 강하며, 완전정수처리를 거친 정수에서도 바이러스의 검출이 보고되고 있다. 또한, 완전처리 (응집-침전-여과-소독)를 거친 외국의 중소규모 정수장 혹은 간이 정수장에서 바이러스 오염으로 인하여 질병이 발생한 예가 보고되고 있어 음용수에 의한 바이러스 감염에 대한 주의가 요구되고 있다[77]. 특히 상수도는 염소소독을 실시하여 병원성 미생물을 제거하여 수인성 질병으로부터 공중보건을 보호하는 중요한 역할을 해왔다. 그러나, 수인성 장관계 바이러스는 일반환경에서 세균보다 적은 농도로 분포하지만 생존력이 높고 염소처리에 대한 내성도 세균보다 강하며, 적은 수로도 감염이 가능하여 장관계 바이러스의 검출은 공중보건학적으로도 매우 중요한 부분으로 인식되고 있다[78].

수중에 존재하는 바이러스를 비롯한 병원성 미생물과 유기물을 적절히 제어하기 위해 현재 부산시에서 사용하고 있는 고도정수처리공정은 활성탄 여과법이다. 이 방법은 활성탄 다공성에 의해 수중의 각종 유해물질들이 활성탄에 잘 흡착되므로 기존의 급속여과법에서는 제거되지 않는 용해성 유기물, 미량 유기화합물, 암모니아성 질소, 철, 망간, 이취미 원인 물질, 소독 부산물 등의 제거에 매우 효과적이어서 구미 각국에서도 고도정수처리에 많이 이용하고 있다

[79]. 또한 입상활성탄 (granular activated carbon : GAC) 공정에서 GAC 파과점을 지나 지속적으로 운전한 결과, GAC 표면에 부착된 미생물의 응집체 (aggregation)에 의한 생물학적 분해 작용으로 인하여 용존유기탄소 (dissolved organic carbon : DOC)가 제거된다는 보고가 알려져 있다[80]. 이것을 생물활성탄 (biological activated carbon; BAC) 공정이라고 하는데[81] 부산시 정수장은 모두 이 공정을 도입하여 운영하고 있다. 또한, 기존에 사용하고 있는 염소 소독에 비해 10배 이상의 산화능을 가지고 있는 오존을 소독제로 사용하는 등 염소소독과 병행한 오존의 활용이 고도정수처리시설에 적극적으로 도입되고있는 실정이다. 2001~2002년에 걸쳐 부산시 상수원수 및 수돗물에 대한 바이러스 분포실태에 대한 제3장의 조사결과 원수에서는 바이러스가 1.92~9.70 MPN/100 L가 검출되고 정수와 수도꼭지에서는 모두 불검출 됨을 보고한 바 있다. 따라서 정수처리공정 어느 단계에서 바이러스가 제거되는지의 여부를 조사하는 것도 필요하다 생각되어진다.

따라서 본 연구는 부산시 정수장에서 운영하고 있는 정수처리공정을 축소한 pilot-plant를 이용하여 정수공정별 수질변화와 세균분포를 조사하여 생물활성탄 정수처리공정의 효과여부를 먼저 평가하고, 부산시 상수원수에서 가장 많이 검출되는 폴리오바이러스 (Poliovirus)를 대상으로 정수처리 공정별로 바이러스 제거효율을 조사하였다. 또한 현재 국내 정수장에서 소독제로 각광받고 있는 오존

을 농도 및 시간별로 처리하여 바이러스를 불활성화 할 수 있는 최적의 조건을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

4-1. 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. 4-1), BAC 운영조건은 Table 4-1과 같다. 원수는 낙동강 하류지점인 매리 취수장의 표층수를 사용하였고, 응집제로는 PSOM (Polyaluminum Sulfate Organic Magnesium)을 사용하였다. 또한 본 실험장치의 입상활성탄의 재질은 석탄계 (F-400, Calgon) 재생탄이며 여과층의 깊이는 2.5m이고 입상활성탄의 물성치는 Table 4-2와 같다.

4-2. 오존처리 장치

오존처리 장치는 오존에 강한 재질의 실리콘호스를 이용하여 오존발생기와 반응조를 연결하여 구성하였고 (Fig. 4-2), 오존발생기는 순수공기를 사용하여 무성 방전관 방식의 수냉식인 ozonia사 제품 (Lab2b)을 사용하였다. 오존 접촉조는 높이 1.5m, 직경 0.1m의 아크릴 원통형이며, 상향류 기포형이다. 5000 PFU/㎖의 poliovirus type Ⅲ를 접종한 5 L의 증류수를 오존 접촉조에 채운 다음 오존 농도와 시간을 달리하여 접촉시켰다. 공기는 4 L/min의 일정한 공기유량을 유지시켰으며, 오존발생량은 0.1~0.8 ㎎O_3/L air로 조절하여 변화시켰다. 그리고 오존 주입량

은 접촉시간과 시료의 부피를 이용하여 아래의 식으로 계산하였는데 0.08~6.4 ㎎O_3/L 의 범위로 나타났다.

$$\text{오존주입량}(\text{㎎}O_3/\text{L}) = \frac{\text{오존농도}(\text{㎎}\,O_3/\text{L air}) \times \text{송기량}(\text{L air/min}) \times \text{접촉시간}(\text{min})}{\text{시료부피}(\text{L})}$$

4-3. 정수공정별 수질조사 및 기간

정수공정별에 따른 수질조사는 6단계 즉 원수, 전오존 처리조, 침전조, 여과 수조, 후 오존 처리조, BAC 여과수 (석탄계 여과수)이며, 조사기간은 4년 (1999. 1 ~ 2002. 12)으로 하였다. 조사주기는 수질인자 항목의 경우 주 1회, 부착세균의 생체량 및 생산력 등은 월 1회 간격으로 조사하였다.

4-4. 정수공정별 수질조사 항목 및 방법

생물활성탄 공정에 따른 수질조사 항목의 이화학적 분석은 Standard method[21]와 일본 상수도 시험법[82]에 따랐으며, 이에 대한 분석항목 및 방법은 Table 4-3과 같다. 미생물 항목인 총대장균군 (Total coliforms) 및 대장균 (*E.coli*) 실험은 막여과법을 이용하여 실시하였으며, 빈영양 종속영양세균 (HPC)은 R_2A agar (Difco사) 평판배지에 시료 1 ㎖를 도말한 후 25℃ 배양기에서 14일간 배양하여 형성된 colony를 계수하였다.

4-5. 세균 생체량 측정

종속영양세균의 생체량 (biomass)은 BAC의 습중량 1 g을 건조시킨 후 초음파 처리 (3 min, 37 ㎑, 190 W)하여 세균을 탈리시킨 다음 R_2A agar (Difco사) 평판배지에 시료 1 ㎖를 단계적으로 희석 도말한 후 25 ℃ 배양기에서 2주간 배양하여 습중량 1 g당 colony형성 세균수로 표시하였다.[83,84] 또한 전체 세균을 직접 계수하기 위하여 BAC의 습중량 1 g을 건조시킨 후 초음파 처리 (3 min, 37 ㎑, 190 W)하여 세균을 탈리시킨 시료 1 ㎖를 취하여 sudan black으로 미리 염색된 polycarbonate 막 (0.22 ㎛)에 여과한 다음 0.05% acridine orange로 5분간 염색하여 형광 현미경 (Olympus, BH-2)으로 총세균수를 측정하였다.

4-6. 세균 생산력 측정

BAC에 부착된 세균의 생산력 (bacterial production)은 ^{3}H-thymidine이 DNA에 들어가는 정도로 구하였다.[85] 먼저 건조시킨 BAC 습중량 1 g을 초음파 처리하여 세균을 탈리시킨 시료 2 ㎖에 200 nM [methyl-^{3}H] thymidine 용액 (specific activity : 40~50 Ci/mmol) 1 ㎖와 200 nM cold thymidine 용액 1 ㎖를 첨가한 후 교반 배양기에서 in situ 조건으로 4시간 배양하였다. ATP 용액 (25 g/ ℓ) 100 ㎕와 1 N NaOH 2 ㎖를 첨가하여 100 ℃에서 1시간 동

안 가열하여 DNA를 추출한 후 잠시 냉각시키고 3000 rpm에서 10 분간 원심 분리하였다. 상등액 1 ㎖에 ice-cold 10% trichloroacetic acid 5 ㎖를 첨가하여 반응을 종료시키고 15분 정도 냉각시킨 후 0.22 ㎛ membrane filter로 여과하였다. 이 여지를 vial에 넣고 건조시킨 후 ethyl acetate 1 ㎖와 10 ㎖의 scintillation cocktail (Aquasol-2, Packard Co.)을 넣어 liquid scintillation analyzer (HP, 2500 TR/AB)로 방사선량을 측정하였다. 얻어진 DPM (disintergrate per minute) 값으로부터 Parsons *et al.*[86] 에 의한 식을 이용하여 incorporation된 thymidine의 양을 계산하였다. 생성 세균수는 전환계수 2.0 x 10^{18} cells/mole thymidine을 이용하였고[87], 탄소량으로의 전환에는 2.0 x 10^{-13} g-C/μm^3의 세균 체적당 탄소량과 평균 세포체적인 0.0865 μm^3/cell을 곱한 1.73 x 10^{-14} g-C/cell의 전환율을 사용하였다.

4-7. 세균 동정

세균의 동정은 형성된 colony의 형태학적 특징을 관찰하여 서로 다른 colony를 R_2A 배지에 획선 도말 하여 순수 분리하였다. 순수 분리된 세균은 API 20 NE Kit (bioMerieux, France) 및 생화학적 실험을 실시하고 Bergey's manual의 분류체계에 따라 속 혹은 종명까지 분류 동정하였다.[88]

4-8. 주사전자현미경 관찰

생물활성탄 입자 표면에 부착된 세균들을 관찰하기 위한 주사전자현미경 (scanning electron microscope : SEM) 분석은 건조시킨 BAC 시료에 10 ㎖의 2.5% glutaraldehyde 용액 (in 0.1 M sodium caccodylate buffer, pH 6.8)을 첨가하여 4℃에서 2시간동안 전 고정한 후 0.1 M sodium caccodylate buffer (pH 6.8) 10 ㎖로 전 고정과 같은 조건에서 세정하였다. 1% OsO_4 용액 (in 0.1M sodium caccodylate buffer; pH 6.8) 5 ㎖를 첨가하여 후 고정시킨 후 다시 0.1 M sodium caccodylate buffer (pH 6.8) 10 ㎖로 실온에서 세정하였다. 그리고 각 10 ㎖의 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100% ethanol로 각각의 농도에서 10분간씩 탈수시킨 후,[89] SEM 촬영을 실시하여 BAC 입자에 부착된 세균을 관찰하였다.

4-9. 바이러스 stock 준비

제거실험에 사용한 바이러스는 폴리오 바이러스 type Ⅲ으로써 국립환경연구원에서 분양 받았다. 바이러스 stock를 조제하기 위해 우선 25㎠ 세포배양 플라스크에 배양한 Buffalo Green Monkey kidney (BGM) 세포에 400 ㎕의 바이러스를 접종하여 바이러스 흡착을 위해 20분 간격으로 흔들어 주며 배양기에서 90분간 방치한 후 2% Fetal Bovine Serum (FBS)가 함유된 MEM/L-15 배지를 적절

하게 분주하였다. 바이러스를 감염시키고 3일정도 배양한 후 바이러스를 수거하기 위하여 1,000×g에서 5분간 원심분리 하여 상등액은 따로 모으고 남아있는 pellet은 0.15M phosphate buffered saline (pH 9.4)로 재현탁하였다. -70℃와 36.5℃에서 얼림과 녹임을 3회 반복하여 바이러스를 용출 시킨 후 다시 1,000×g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취해 처음의 상등액과 혼합하였다. 혼합된 바이러스 stock은 1 ㎖씩 vial에 담아 -70℃에 보관하였다.

4-10. 바이러스 정량

바이러스 정량에는 Plaque assay법을 사용하였다 (Fig. 4-3). 위에서 얻은 바이러스 stock을 단계별로 10배 희석하여 6-well plate에 미리 배양한 BGM 세포에 접종한 후 1시간 동안 흡착시킨 후 2% CMC와 1% FBS가 함유된 MEM 배지를 첨가하여 바이러스 감염을 진행시켰다. 3일간 배양 한 뒤, 생성된 plaque의 개수를 세어 ㎖당 바이러스의 수로 계산하였다.

4-11. 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/㎖ 농도의 약독화 폴리오바이러스 정도관리용 저장용액 1 ㎖를 첨가하였다. 잘 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 3~4일전에 배양된 BGM 세포에 각각 감염시켜 세포병변현상 (CPE : Cytopathic effect) 여부를 관찰한 후 MPN program을 이용하여 수치를 산출하였다.

4-12. 정수공정별 바이러스 제거율 조사

실험은 3차 증류수 30 L에 바이러스 stock 1 ㎖ (5000 PFU)를 첨가하여 3 ㎖/min 정도로 일정하게 들어가도록 정량펌프를 이용하여 원수 유입조에 주입하였다. 시료 채수는 미국 EPA의 ICR 및 환경부에서 권장하는 표준필터장치를 조합하여 사용하였다. 시료 채수는 1-MDS filter를 이용하여 원수·전 오존은 200 L~300 L를 침전·여과·후오존·BAC 여과 그리고 정수는 1,600 L 이상을 여과하였다. 본 실험에 사용된 filter는 수중에서 negative charge를 띄고 있는 바이러스를 포함한 수중의 모든 유기물질을 흡착할 수 있도록 제조된 것으로 표면자체가 positive charge를 띄고 있다. 채수한 시료의 전처리는 미국 EPA의 ICR 방법 및 환경부에서 정한 표준시험방법에 준하여 수행하였다[18]. 멸균 튜브가 장착된 연동펌프 (peristaltic pump)를 사용하여 50 mM glycine이 함유된 1.5% beef extract 완충

액 (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 유무를 확인하였다. 탈리액을 2,500 ×g, 4℃에서 15분간 원심분리 하고 상등액을 제거한 후 0.15 M PBS (pH 9.4) 30 ㎖를 첨가한 후 완전히 용해시켰다. 용해된 침전물을 7,000 ×g로 4℃에서 10분간 원심분리 한 후, 상등액만 취하여 1 M HCl로 pH 7.0~7.5로 조정하였다. 미생물 오염을 제거하기 위해 0.22 ㎛ 멸균 필터를 이용하여 상등액을 여과하였다. 여과시킨 상등액을 3~6일간 배양된 세포배양 플라스크 (25㎠)의 BGM 세포주에 접종하였다. 음성대조구 및 양성대조구는 각각 0.15 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 7.4) 용액과 순화된 poliovirus type Ⅲ를 0.15 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 용액으로 희석하여 시료 접종량과 동일하게 접종하였다. 배양기에서 BGM 세포에 시료를 흡착시키되 15분 간격으로 배양용기를 좌우로 가볍게 기울여 접종된 시료가 골고루 세포에 흡착되도록 하였다. 접종 80~120분 후 세포 배양플라스크에 2% FBS가 함유된 MEM/L-15 배지를 분주한 후 14일간 배양하며 세포병변 현상을 관찰하였다. 원수·전오존수는 100 L, 침전수는 300 L, 여과수·후오존수·BAC 처리수 그리고 정수는 1,000 L를 기준으로 환산하였으며 실험은 3회 실시하였다.

4-13. 오존농도별 바이러스 제거율 조사

먼저 시료를 3차 증류수 5 L에 정량화된 바이러스 stock 1 ㎖ (5000 PFU)를 첨가하여 조제하였다. 조제된 3차 증류수 5 L를 펌프로 오존 발생장치 내로 순환시키고 오존 발생기 (generator)를 사용하여 오존 발생량을 일정하게 유지시켜 시료와 시간별로 반응시켰다. 반응시킨 5 L 시료는 압력 여과장치를 이용하여 여과하였다. 사용된 여과지는 수중에서 negative charge를 띄고 있는 바이러스의 흡착이 잘 되도록 표면 자체가 positive charge로 이루어져 있는 0.22㎛ membrane filter (Hybond-N^+, RPN 303B, Amersham pharmcia bioech.)로 여과한 후 여지를 1 L의 50 mM glycine이 함유된 Beef extract (1.5%)이 들어있는 5 L 플라스크에 즉시 넣어 30분 동안 교반시켜 여지에 흡착되어 있는 바이러스를 탈리시켰다. 탈리 후의 실험과정은 Pilot-plant 공정수정별 제거실험과 동일하게 유기응집 농축법을 이용하여 처리하였으며, 잔류 오존은 KI 용액으로 측정하였다. 실험에 사용된 모든 초자 기구는 0.1% 염소용액으로 30분 이상으로 소독하여 2% 티오황산나트륨으로 중화시킨 후 다시 3차 증류수로 여러 번 씻은 후 121℃, 20분간 멸균하여 건조한 후 사용하였으며 실험은 3회 실시하였다.

4-14. 세포배양

바이러스 배양에는 국립환경연구원에서 분양받은 BGM (Buffalo Green Monkey kidney, passage 135) 세포를 사용하였다. BGM 세포주의 배양액은 penicillin-streptomycin 용액과 amphotericin (fungizone) 용액이 혼합된 항생제와 10% FBS (Fetal Bovine Serum)가 첨가된 MEM/L-15 배지를 사용하였다. 세포의 계대는 우선 monolayer가 형성된 BGM 세포주를 배양기에서 꺼내어 배양용기 안에 있는 배지를 우선 제거한 후 trypsin-EDTA를 세포배양용기에 적정량 (약 10㎖)을 넣고 37℃, CO_2 배양기에 5분 정도 방치하였다. BGM 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㎠)에 분주하여 37℃, 5% CO_2의 배양기에서 배양하였다.

4-15. ICC-PCR (Intergrate Cell Culture - Polymerase Chain Reaction)

바이러스 검출을 위한 primer는 poliovirus genome를 특이적으로 검출할 수 있는 5′ NCR 부분의 염기서열[90]을 사용하였다 (Fig. 4-4, Table 4-4). 1, 2차 세포배양액 200 ㎕를 500 ㎕의 GT (5M guanidium thiocyanate, 50mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 8% 2-mercaptoethanol)와 섞은 후, phenol/chloroform법으로 RNA를 추

출하였다[90]. 추출한 RNA를 70℃에서 3분간 가열하여 변성시키고, 미리 준비한 cDNA 합성혼합물 (5× 반응 완충액, 3mM dNTP, 150pmol reverse primer (PEV-R), 250U M-MLV 역전사효소 (Promega사)를 넣어 37℃에서 1시간 동안 합성하였다. 95℃에서 5분간 열을 가하여 반응을 종결시킨 다음 PCR을 위한 주형으로 사용하였다. PCR 반응액은 총 100 $\mu\ell$[cDNA, 10× 반응 완충액, 1.5mM $MgCl_2$, PEV-F, PEV-R 각각 50pmol/$\mu\ell$, 5U/$\mu\ell$ Taq polymerase (Takara사), H_2O]이 되도록 하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR은 95℃에서 30초, 56℃에서 45초, 72℃에서 45초 동안 40번을 반복시켜 PCR 산물을 얻었다. PCR 반응 결과 생겨난 산물을 1.2% agarose gel에 전기영동 하여 394 bp의 PCR 산물의 형성 유무를 확인한 후 최종적으로 이를 주형으로 하여 내부에 있는 primer를 작성하여 nested PCR를 실시하여 309 bp 산물의 정확성을 재확인하였다.

결과 및 고찰

4-1. 정수처리 공정별 수질변화

낙동강 하류의 매리취수장 원수를 사용하여 BAC 공정을 거치는 동안 각 정수 단계별 수질변화를 측정하여 4년 동안의 평균치를 분석한 결과는 Table 4-5와 같다. 원수가 전 오존 처리조에서 침전조 · 여과조를 거쳐 후 오존처리 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 날수 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[37]. 본 연구의 조사기간 중에는 빈번한 강우에 의한 조류 농도의 감소 등으로 인하여 예년에 비해 원수의 수질은 전반적으로 양호한 것으로 나타났다.

4-2. 생물활성탄의 미생물학적 특성

BAC 유출수의 종속영양세균은 평균 1.5~3.0 × 10^4 CFU/㎖로 Servais 등[91]이 조사한 4.1 × 10^4~1.5 × 10^7 CFU/㎖ 보다 낮은 세균 유출을 보여 정수처리 공정은 적절하게 운영되어지는 것으로 보여진다.

BAC에 부착된 세균의 생체량은 전반적으로 BAC 여과 표층에서 0.6~98 × 10^7 CFU/g, 저층에서 0.5~3.6 × 10^7 CFU/g 범위를 보였는데, 이는 金[92]이 조사한 10^6~10^7 CFU/g 보다는 약간 높은 것으로 나타났다. 한편 acridine orange를 이용한 세균의 직접 계수에 의하면 총 세균 생체량은 표층에서 5.3~16 × 10^8 cells/g의 범위를 보였다. 그리고 세균 생산력은 표층에서 0.7~7.1 ㎎-C/m^3h, 저층에서 0.3~5.7 ㎎-C/m^3h로 나타나, Servais 등[91]이 조사한 20~60 ㎎-C/m^3h 보다는 낮은 경향을 보였다. 세균의 생체량과 생산력에 대한 실험 결과로 볼 때 세균은 주로 BAC 여과표층에 더 많이 분포하고 있음을 알 수 있었고, 계절별로는 모두 하계에 높게 나타나 수온이 높으면 세균의 활성도 역시 높은 것으로 나타났다.

BAC에 부착된 세균들을 동정한 결과 *Pseudomonas*속이 평균 50.5%로 가장 많은 분포를 보였고 그 다음으로 *Flavobacterium*속 20.9%, *Alcaligenes*속 4.8%, *Acinetobacter*속 2.5%, *Aeromonas*속 2.2% 순으로 검출되었으며, 10%의 세균은 동정되지 않았다. 이는 Stewart

등[93]이 조사한 연구결과 즉 생물활성탄에 부착된 세균으로는 주로 *Pseudomonas, Alcaligenes, Bacillus, Acinetobacter, Aeromonas, Chromobacterium*속 등이 있는 것으로 알려진 결과와 비슷한 경향을 보였다. 또한 계절적으로는 주로 춘계와 하계에 *Pseudomonas cepacia*, 동계에는 *Pseudomonas vesicularis*가 많이 분포하였다 (Table 4-6). 이렇게 계절별로 부착세균의 우점종이 다른 이유는 활성탄의 조직 크기, 표면 조직, 유속율 등의 차이에 의해 세균이 활성탄에 부착할 수 있는 환경 조건이 다르기 때문인 것으로 판단된다. 그리고 BAC 입자표면에 부착된 세균들의 분포를 주사현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 4-5에서 보는 바와 같이 세균이 활성탄 입자표면에 많이 부착되어 있었으며, 여과 저층보다 표층의 활성탄에 세균이 보다 많이 존재함을 확인할 수 있었다.

4-3. 바이러스 정량 및 회수율

바이러스 정량은 Plaque assay법을 이용하였는데 생성된 ㎖당 바이러스의 수를 측정하여 정량한 결과 ㎖당 6×10^5 PFU의 수를 얻을 수 있었다.

바이러스 회수율은 1-MDS catridge filter로 여과시켜 유기응집법을 이용하여 농축시켰다. 농축시킨 양성 시료는 원액, 1:5, 1:25 희석배율로, 음성 농축액 ($Na_2HPO_4 . 7H_2O$, pH 7.4)은 원액 농도로 각각 BGM 세포에 1 ㎖씩 접종한 후 14일간 배양하여 CPE 여부로 확인

하였다. MPN program으로 산출한 결과 120~250 MPN/100L로 나타났으며, 회수율은 60~120%를 보여 표준시험방법에서 규정한 회수율 35~150% 기준을 만족하는 것으로 나타났다.

4-4. 정수처리 공정별 바이러스 제거율

정수처리공정에 따른 바이러스 제거효율은 맥동식 Pilot-plant를 이용하여 3회 실시하였다. 원수 분배 탱크조에 5000 PFU/㎖의 바이러스를 주입한 후 정수처리 공정별로 시료를 채취하였다. 원수 분배 탱크조를 통과한 시료는 전 오존 접촉조·침전·여과·후 오존·BAC 여과를 거쳤으며, 각 공정별로 500~1500 L의 시료를 여과, 농축하여 세포배양 및 ICC-PCR법으로 실험하였다 (Fig. 4-6). 200 L의 원수에서 정량된 바이러스를 기준으로 하였을 때 전 오존 접촉에서는 96.8%의 바이러스가 제거되었는데 이때 Pilot-plant의 전 오존 투입비는 1 ㎎/L였다. 전 오존을 거친 침전단계에서는 99.3%, 사여과에서는 99.6%의 바이러스가 제거되었으며, 후 오존을 거친 BAC 여과수 시료에서는 세포배양법 및 ICC-PCR법 모두에서 바이러스가 100% 제거되어짐을 확인할 수 있었다 (Table 4-7). 지표세균인 총대장균군의 경우 원수에서는 평균 430 MPN/100㎖ 검출되었으나 후오존을 거친 BAC 여과수 부터 검출되지 않았고, 대장균의 경우에는 전 오존 단계 이후부터 검출되지 않아 바이러스와 비슷한 제거 경향을 보였다. 따라서 오존이 주입되는 전·후 오존 과정이 정수처리

과정에서 바이러스 및 미생물 농도를 감소시키는데 있어서 가장 효율적인 단계임을 알 수 있었다.

그리고 이러한 바이러스 제거율은 규모가 비슷한 Pilot-plant를 사용하여 조사한 Robeck[94]의 침전단계에서 98%, 여과단계에서 99.84% 제거율과 거의 비슷한 결과를 보였는데, 적절한 정수처리공정을 유지하여 BAC 여과를 거치면 대부분의 바이러스는 정수처리 과정에서 거의 100% 제거될 수 있음을 확인 할 수 있었다.

이번 공정별 제거실험 결과 다음과 같은 문제점을 고려해야 할 것으로 생각되어진다. 먼저 바이러스 검출방법론인데 본 실험에서는 세포배양법과 ICC-PCR 방법을 혼용하여 사용하였는데 후자의 방법이 전자보다 더 민감한 검출법으로 확인되었다. 이러한 결과는 Reynold[95] 등이 조사한 결과와 거의 일치하였으며, 따라서 수인성 장관계 바이러스의 검출은 국민 보건학적 관점에서 아주 중요하기 때문에 세포배양법을 이용하여 바이러스를 어느 정도 증식시킨 뒤 PCR 방법으로 검출하기 때문에 감염성 바이러스를 (PCR 방법에 비해 장점) 빠른 시간에 (세포배양법에 비해 장점) 검출할 수 있고, 세포배양법과 PCR 보다 각각 10배정도 높은 감수성을 가진 ICC-PCR 방법을 바이러스 표준시험방법으로 추가하여 검증해야 할 것으로 생각되어진다[55,56]. 둘째로 이번 실험에서는 폴리오바이러스만을 대상으로 하였으나 강물에 많이 존재하는 것으로 알려진 레오바이러스나 콕사키바이러스 등에 대한 공정별 제거실험도 향후 실시하여 바

이러스 종류별 제거효율을 정확히 파악하여 제거기법을 축적해야 할 것으로 생각된다.

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

4-5. 오존처리에 따른 바이러스 제거율

Pilot-plant에 의한 정수처리공정별 바이러스 제거율 조사에서 전오존 단계에서 바이러스 대부분이 불활성화 되어졌으므로 오존에 의한 바이러스 제거특성을 세부적으로 살펴보고자 하였다. 오존 농도에 의한 바이러스 제거 실험은 오존처리 장치를 이용하여 실시하였다. 5000 PFU/㎖의 poliovirus Ⅲ형을 증류수 5 L에 섞어 오존 접촉조에 넣고, 오존 발생량을 고정하고 접촉시간을 변화시킴으로서 오존 주입량에 따른 바이러스 불활성화율을 살펴보았다. 바이러스의 존재유무는 세포배양법과 살아있는 바이러스를 3~4일 정도 세포배양 시킨 후 다시 대량 증폭시켜 낮은 농도의 바이러스까지 검출할 수 있는 ICC-PCR법으로 확인하였다 (Fig. 4-8). 세포배양법에 의한 바이러스 확인 실험결과 0.4 ㎎/L의 오존이 5분간 접촉되었을 때

바이러스는 약 61.1%이상이, 0.8 ㎎/L의 오존농도를 10분간 접촉시킨 후에는 바이러스의 100%가 불활성화 되어졌음을 알 수 있었다. 그러나 1차 실험에서도 0.8 ㎎/L의 오존농도를 10분간 접촉했을때 ICC-PCR법에 의해 바이러스가 검출되었으며, 2차 실험까지 진행시켰을 경우에는 세포배양법과 ICC-PCR법 모두에서 바이러스가 검출되었다. 따라서 바이러스의 완전한 제거를 위해서는 0.8 ㎎/L에서 10분 이상의 오존처리농도가 요구되어지는 것으로 나타났다 (Table 4-8, 4-9). 이는 Harakeh 등[91]이 조사한 잔류오존 0.2 ㎎/L에서 10~15분간 접촉하였을때의 제거율 80~97% 와는 약간 차이를 보였는데 이에 대한 추가적인 검증이 이루어져야 할 것으로 생각되어진다.

오존에 의한 바이러스 제거실험에서의 문제점은 오존 접촉시 생성되는 부산물의 발생이다. 오존은 무색의 자극성 냄새를 가지고 있는 기체로써 강력한 산화력을 가지고 있으며 산소원자 3개로 결합 구성되어 있다. 따라서 오존은 염소나 이산화염소 등과 같은 소독제보다 훨씬 작은 접촉시간과 농도로 소독할 수 있는 강한 산화제이며, 3차 처리에 사용되었을 때 무기염과 2차 오염물질을 생산하지 않으며, 처리수에 맛과 냄새를 남기지 않으며 바이러스를 포함한 병원성 미생물에 대해 넓은 범위의 높은 살균력을 가지고 있는 강력한 소독제이다[97]. 그러나 오존은 급수시설에서 잔류성을 유지할 수 없기 때문에 1차 소독제로만 사용할 수 있으므로 완벽한 소독체계를 위해서 염소, 클로라민 등 2차 소독제와 결부시켜야 하고, 알데

하이드류, 케톤류, 카르보닐 화합물 등의 오존 살균 부산물과 OH radical, O_2 등의 ROS (Reactive Oxygen Species) 생성 등의 단점이 있다. 현재 바이러스를 비롯한 병원성 미생물을 제거할 수 있는 기법이 활발히 연구되고 있는데 대표적인 것이 막 (Membrane) 여과법과 UV (Ultra-Violet) 조사법이다. 막 여과는 고형물을 제거하기 위한 반투과막을 통과시키는 과정으로 여과 시스템에서 여과지 대신 막을 사용한다는 것을 제외하고는 다른 여과공정과 비슷하며 바이러스, 작은 콜로이드, 용존 성분 제거에 효과적인 것으로 보고되고 있다[98]. 그러나 적절한 운영을 하지 못하면 Biofouling이 발생하는 등의 단점이 있다. 대부분의 소독제와는 달리 UV는 병원균 불활성화를 달성하기 위한 시간과 비슷한 시간을 필요로 하는 물리적인 과정이다. 그러나 다른 소독제와 같이 UV도 소독제로서 한계를 가지는데 물리적인 소독제이기 때문에 급수체계에서 병원균 증식과 생물막을 조절하기 위한 잔류성을 제공하지 못하며 1차 소독제로 UV를 사용할 때 2차 소독제로 급수시설에 다른 화학제를 사용해야 하는 등의 단점이 있다[99].

물 공급에 있어서 중요한 문제는 어떻게 하면 바이러스, 원생동물 등과 같은 병원성 미생물을 제거하면서 동시에 소독 부산물을 최소화시킴으로써 모든 위험으로부터 보호할 수 있는지의 여부에 초점이 맞추어지고 있다. 이러한 흐름에 따라 기존의 단편적인 수질관리에서 벗어나 음용수 수질의 관리가 미생물 제거와 소독 부산물의

위해성 감소를 동시에 만족시킬 수 있는 방향과 함께 비용 효과적인 면도 고려해야 할 것으로 판단되어진다[100].

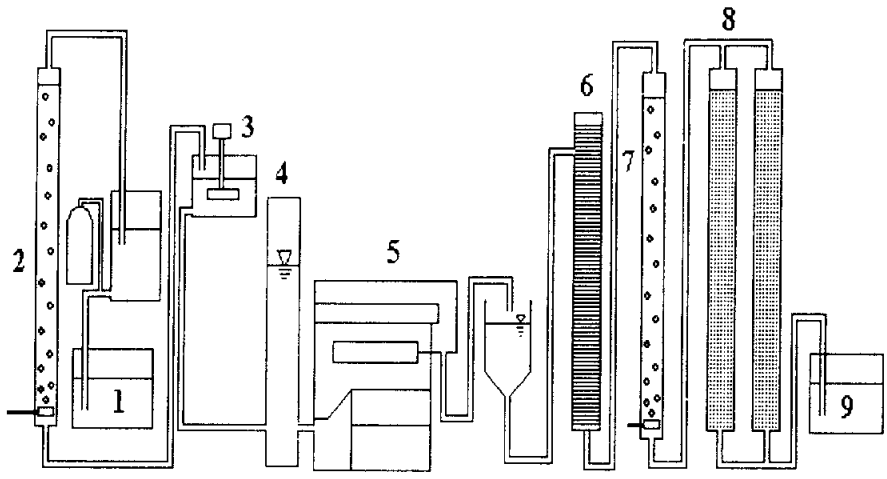


Fig. 4-1. Schematic diagram of a pilot-plant for water treatment.

1. raw water distributed tank 2. pre-O_3 contactor 3. coagulant mixer 4. circulator tank 5. pulsator 6. settling tank 7. post-O_3 contactor 8. BAC column 9. clean water tank

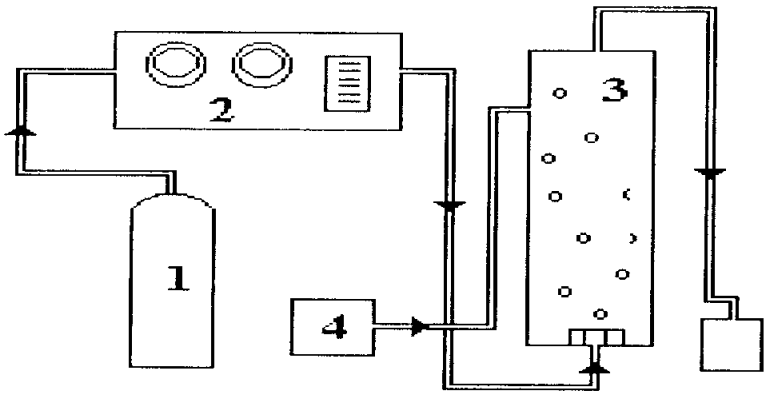


Fig. 4-2. Schematic diagram of oxidation process.

1. air 2. ozone generator 3. ozone contactor 4. sample pump

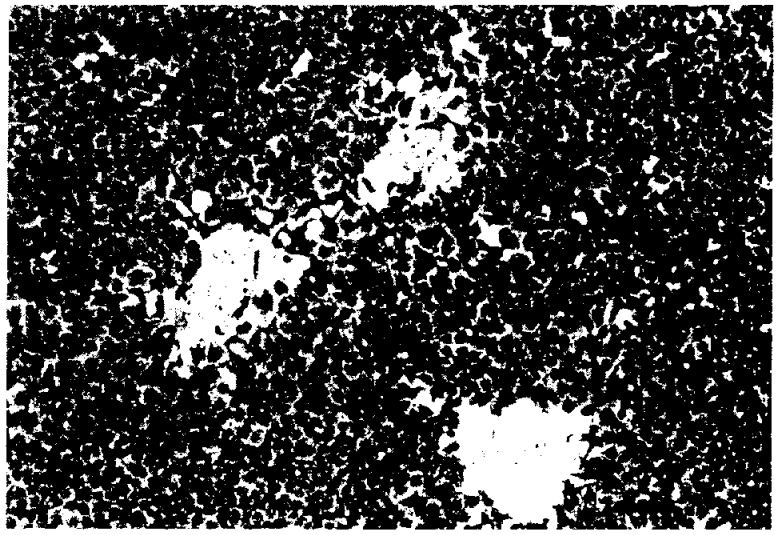


Fig. 4-3. Plaque Assay for poliovirus titeration, Photograph was taken under microscope (×300) after staining with crystal violet.

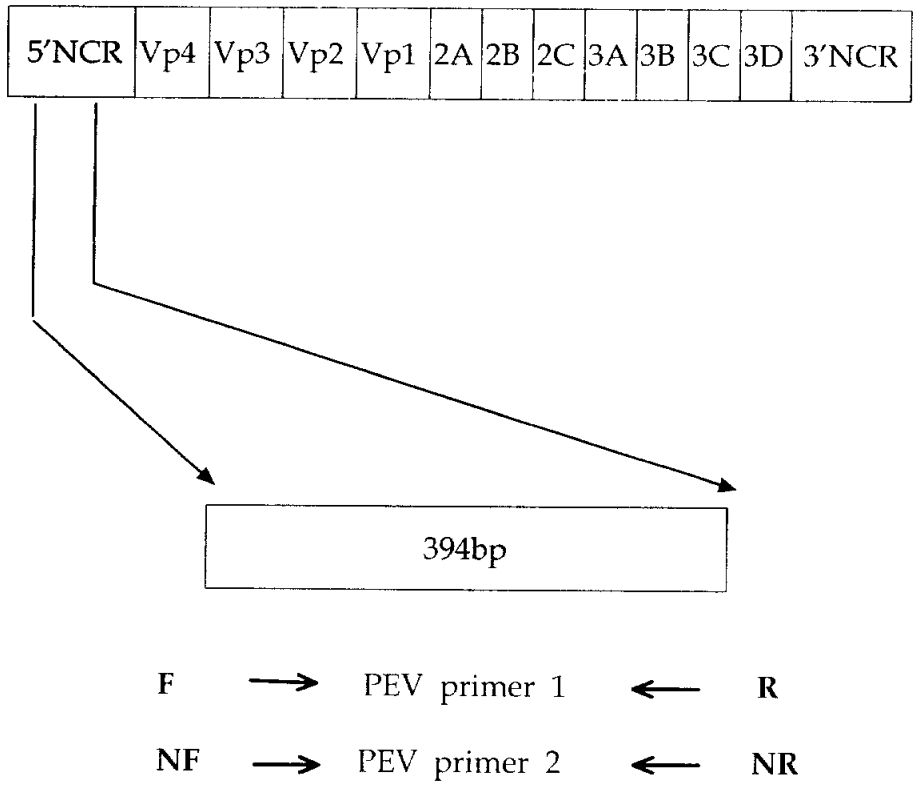


Fig. 4-4. **Schematic diagram of PCR-targetted gene fragment position in genome of poliovirus.**

Fig. 4-5. Scanning electron micrograph of bacteria attached on particles of BAC. The carbon particles were taken from upper part of coal-based BAC reactor. Bars; 5 μm.

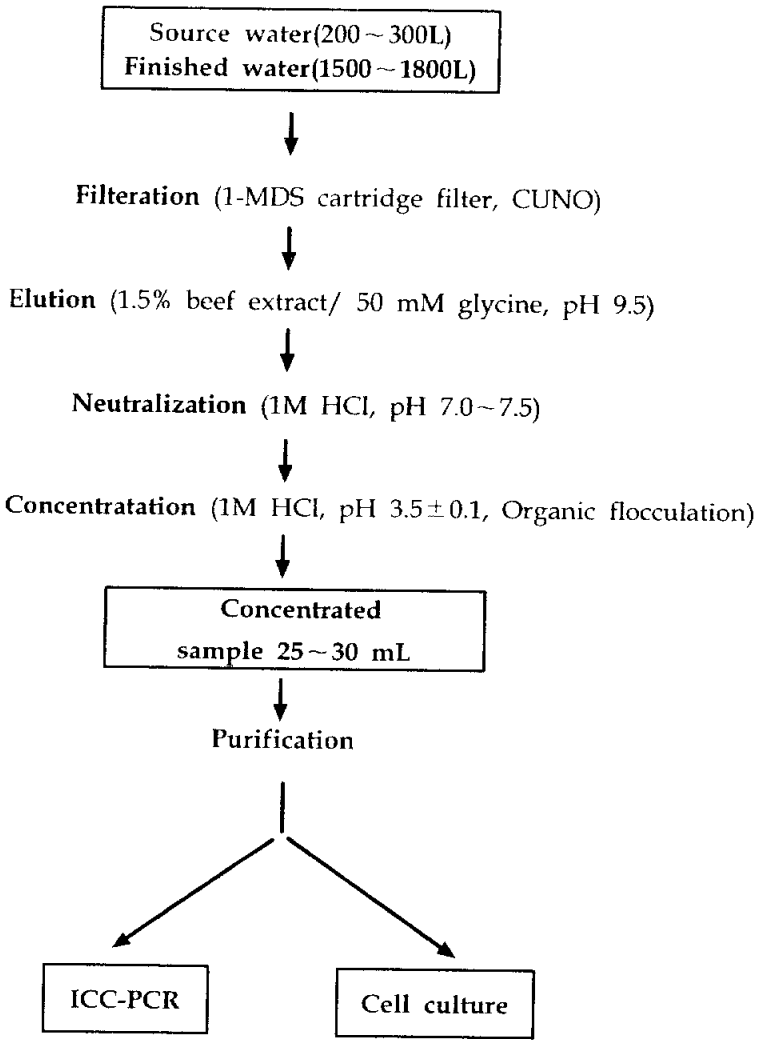


Fig. 4-6. Schematic view of virus detection from water samples.

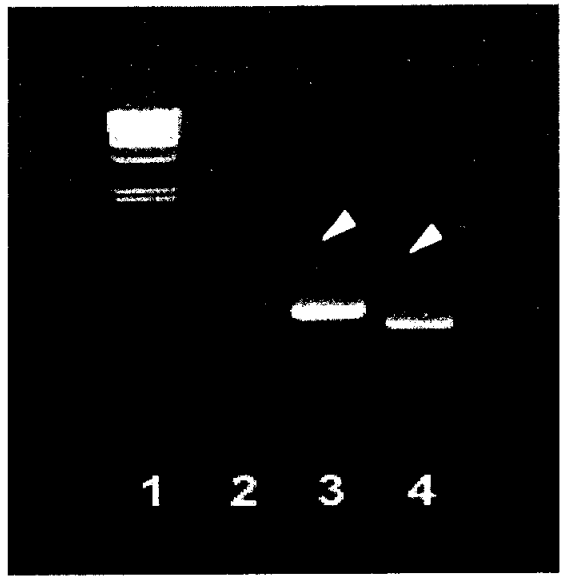


Fig. 4-7. Detection of poliovirus by ICC-PCR.

Lane 1 : Size marker

Lane 2 : ICC-PCR after mock infection (negative control)

Lane 3 : ICC-PCR by PEV primer 1 (394bp)

Lane 4 : ICC-PCR by PEV primer 2 (309bp)

Table 4-1. Operating conditions of water treatment process using biological activated carbons.

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

Table 4-2. Specification of granular activated carbons(Coal-based).

Item	Property
Apparent density(g/㎤)	0.43
Hardness number(%)	98
Iodine value(mg/g)	1050
MB adsorption(㎖/g)	256
Residual materal after mesh (8 x 32 mesh)	99.5
Specfic surface area(m^2/g)	1100
Total pore volume(㎤/g)	0.61
Mean pore radius(Å)	23

Table 4-3. Analytical method and instrument.

Item	Methods and instrument
pH	pH meter(Orion model 260)
Turbidity	Turbidimeter(HACH 2100 AN)
UV_{254}	UV-Vis spectrophotometer(HP 8452 A)
NH_4-N	Indophenol method
$KMnO_4$	Acid titration method
THMFP	Head space method (Gas chromatography HD 5890 SERIES 2)
Mn, Fe, Al	ICP(Jobin Yvon 50P)

Table 4-4. Primer pairs used for detection of Poliovirus

Target	Poliovirus 5'NCR	
Sequence (5'-3')	PEV 1F	acggacacccaaagta
	PEV 1R	agcacttctgtttccc
	PEV 2NF	caagcacttctgtttccccg
	PEV 2NR	ggattagccgcattcaggg

Table 4-5. Water quality from each step of water treatment process using biological activated carbon.

Parameter \ Step	1	2	3	4	5	6
pH	7.7 (±0.4)	7.7 (±0.3)	7.1 (±0.2)	7.2 (±0.2)	7.4 (±0.2)	7.2 (±0.3)
Turbidity (NTU)	16.29 (±16.80)	14.39 (±15.41)	2.38 (±3.18)	0.34 (±0.13)	0.36 (±0.24)	0.20 (±0.07)
$UV_{254}(cm^{-1})$	0.0551 (±0.0112)	0.0341 (±0.0113)	0.0212 (±0.0092)	0.0236 (±0.0319)	0.0104 (±0.0043)	0.0079 (±0.0030)
NH_3-N(mg/ℓ)	0.06 (±0.11)	0.06 (±0.12)	0.07 (±0.19)	0.04 (±0.15)	0.03 (±0.10)	0.02 (±0.09)
$KMnO_4$(mg/ℓ)	9.5 (±2.6)	7.4 (±2.7)	3.8 (±1.2)	2.8 (±1.0)	2.5 (±0.9)	1.4 (±0.5)
THMFP(μg/ℓ)	64.9 (±23.1)	45.3 (±17.1)	26.0 (±9.5)	21.6 (±8.5)	18.0 (±7.4)	11.3 (±5.1)
Mn(mg/ℓ)	0.01 (±0.01)	0.01 (±0.01)	N	N	N	N
Fe(mg/ℓ)	0.21 (±0.24)	0.23 (±0.30)	0.06 (±0.20)	0.02 (±0.06)	0.01 (±0.04)	0.01 (±0.02)
Al(mg/ℓ)	0.32 (±0.34)	0.37 (±0.39)	0.21 (±0.19)	0.05 (±0.06)	0.05 (±0.04)	0.01 (±0.02)
Bacteria (CFU/mℓ)	32,000	2,500	21,000	28,500	500	15,000
Total coliforms (MPN/ 100mL)	430	2	10	12	N	N
E.coli (MPN/ 100mL)	5	N	N	N	N	N

※ Values are expressed as average from weekly measurements during one year. Step 1 is a water sample from raw water tank. Step 2 from pre-O_3 contactor. Step 3 from sedimentation basin. Step 4 from filtered water tank. Step 5 from post-O_3 contactor. Step 6 from coal-based BAC effluent.

Table 4-6. Seasonal distribution of bacteria in coal-based BAC.

	Mar. 5	Jun. 4	Oct. 4	Dec. 10
Acinetobacter haemolyticus	+	+	-	-
Acinetobacter alcaligenes	+	+	-	-
Aeromonas hydrophila	+	-	+	+
Alcaligenes faecalis	+	+	+	-
Alcaligenes odorans	+	-	-	-
Flavobacterium breve	+	+	+	+
Flavobacterium indolgenes	-	+	+	+
Flavobacterium menigosepicum	+	-	+	-
Pasteurella haemolytica	+	+	+	-
Pseudomonas vesicularis	+	+	+	++
Pseudomonas aureofaciens	+	+	-	-
Pseudomonas fluorescens	+	+	+	-
Pseudomonas cepacia	++	++	+	+

* Presence of the bacteria was detected in 1999.

* Symbol "++" is expressed as a dominant species.
Symbol "+" is expressed as a detectable species.
Symbol "-" is expressed as a non-detectable species.

Table 4-7. Elimination of virus after each step of water treatment process.

Step	Mean virus density (MPN/L)	% of Virus remained	Cell culture	ICC-PCR
Raw water	71.12	100	+	+
Pre-ozone	2.288	3.22	+	+
Sedimentation	0.4689	0.66	+	+
Sand filter	0.2877	0.40	+	+
Post-ozone	0	0	-	-
BAC	0	0	-	-
Finished water	0	0	-	-

* Symbol "+" is expressed as virus detectable on cell culture or by ICC-PCR. Symbol "-" is expressed as non-detectable.

Table 4-8. Survival rate of virus contact with initial concentrations of ozone

Virus	Time(min)					
	1	3	5	8	10	15
Polivirus type III	59.3	42.4	38.9	28.8	0	0
Initial Ozone dose concentraton (㎎O_3/L)	0.08	0.24	0.40	0.64	0.80	1.2
Residual ozone (㎎O_3/L)	0	0	0	0	0.08	0.1

※ Supplied ozone concentrated was 0.1 ㎎O_3/L air

Table 4-9. Comparison of Cell culture and ICC-PCR to detect poliovirus inactivation by ozone.

Exposure to ozone (min)	Initial Ozone dose conc. (mgO_3/L)	First passage		Second passage	
		Cell culture	ICC-PCR	Cell culture	ICC-PCR
1	0.08	+	+	+	+
3	0.24	+	+	+	+
5	0.40	+	+	+	+
8	0.64	+	+	+	+
10	0.80	-	+	+	+
15	1.20	-	-	-	-

* Symbol "+" is expressed as virus detectable.

Symbol "-" is expressed as non-detectable.

국 문 초 록

본 연구의 목적은 낙동강 수계 하류의 대표적인 유해 생물체인 남조류와 바이러스의 분포현황을 체계적으로 조사하고 아울러 분리를 실시하여 계절적 특성 등 오염실태를 정확히 밝히고, 또한 검출된 유해생물을 효과적으로 제거할 수 있는 방법을 확립하는데 있다.

먼저, 남조류 *Microcystis aeruginosa*를 무균적으로 분리하기 위해 낙동강 물금 지역의 수화를 멸균 증류수로 vortex 전처리를 하였으며, 세균제거 및 무균 상태를 계속 유지하기 위하여 항생물질 (ampicillin 150 ㎍/㎖, neomycin 25 ㎍/㎖)을 배지에 첨가하고, 독립 집락으로 형성시켜 오염 기회를 줄이기 위하여 0.7% agarose로 고형화 시킨 CB 고체배지에서 30℃, 40 μmol m^{-2} s^{-1} 광 조건으로 배양하였다. 그 결과 분리되어진 26개의 *Microcystis aeruginosa* colony 중 3개의 무균 균주만이 확보되었다. 3개의 무균균주를 16S rRNA primer를 이용하여 PCR 증폭한 결과 *M. aeruginosa* AF 139292와 99.5에서 100%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다.

응집제에 의한 *Microcystis aeruginosa* 제어기법 개발을 위해 낙동강 하류지역에서 무균적 및 현장 채취한 *M. aeruginosa*을 대상으로 살조 효과를 조사하였다. 응집제를 이용한 *M. aeruginosa* 제거실험에서 무균 분리 및 현장 채취한 경우 모두 Ceramic-Zeolite type Co 100의 1.5 ㎎/ℓ 농도에서 24시간 이내에 모두 응집 침전 제거

되었다. 그러나 적조가 발생하였을 때 가장 많이 사용되고 있는 황토의 경우 10 ㎎/ℓ 농도에서도 제거효율이 낮아 투입된 농도에 비해 제어효과가 적은 것으로 나타났다. 따라서 Ceramic-Zeolite type Co 100이 이번 실험에서 가장 뛰어난 응집제 임을 알 수 있었다.

미국 EPA (Environment Protection Agency)와 환경부에서 규정하고 있는 표준검출법인 총세포배양법 (Total Culturable Virus Assay : TCVA)을 이용하여 부산시 상수원수 및 정수장을 대상으로 2001년 7월에서 2002년 11월까지 바이러스 검사를 실시하였다. 검사결과 21개의 상수원수 시료 중 13개 시료에서 CPE (cytopathic effect)가 확인되어 61.9%의 양성률을 보였으며, 정수 및 수도꼭지수에서는 모두 검출되지 않았다. 또한, 검출된 바이러스를 계절별로 보면 주로 여름철과 초겨울에 분포하는 특성을 보였다. 검출된 바이러스는 TCVA-MPN 방법에 의해 1.92~9.70 MPN/100 L의 범위로 정량 되었으며, 면역형광법 (Immunofluorescent assay)에 의해 human poliovirus type I 과 enterovirus로 동정되었다.

낙동강 하류의 매리취수장 원수를 사용하여 생물활성탄에 의한 pilot plant 공정을 운전하면서 수질인자들의 변화와 세균분포 특성을 조사한 결과 BAC 여과를 거치면서 NH^{+}_{4}-N 등을 포함한 모든 항목들은 거의 제거됨을 알 수 있었다. 또한 석탄계 BAC에서의 세균 생체량과 생산력은 각각 9.8 × 10^{8} CFU/g 및 7.1 ㎎-C/m^{3}h로

서의 높은 세균 활성도를 보였다. 활성탄 부착 세균으로는 전반적으로 *Pseudomonas*속, *Flavobacterium*속, *Alcaligenes*속, *Acinetobacter*속, *Aeromonas*속 순으로 검출되었다. Pilot-plant를 이용한 정수처리공정별 폴리오 바이러스 제거실험에서 전오존 접촉에 의해 96.8%, 전오존을 거친 침전단계에서는 99.3%, 사여과에서는 99.6%의 바이러스가 제거되었으며, 후오존을 거친 BAC 여과수 시료에서는 세포배양법과 ICC-PCR법 모두에서 바이러스가 100% 제거되어짐을 확인할 수 있었다. 오존농도에 의한 폴리오 바이러스 제거실험 결과 0.4 ㎎/L에서 5분간 접촉되었을 때는 약 61.1%이상이, 0.8 ㎎/L에서 10분간 접촉시킨 후에는 100%의 바이러스가 불활성화 되어졌음을 알 수 있었다. 따라서 폴리오 바이러스의 완전한 제거를 위해서는 0.8 ㎎/L에서 10분 이상의 오존농도가 요구되어지는 것으로 나타났다.

물 공급에 있어서 중요한 문제는 어떻게 하면 남조류나 바이러스와 같은 병원성 미생물을 제거하면서 동시에 소독 부산물을 최소화시킴으로써 모든 위험으로부터 보호할 수 있는지의 여부에 초점이 맞추어지고 있다. 이러한 흐름에 따라 기존의 단편적인 수질관리에서 벗어나 음용수질의 관리가 미생물 제거와 소독 부산물의 위해성 감소를 동시에 만족시킬 수 있는 방향과 함께 비용 효과적인 면도 고려해야 할 것으로 판단되어진다.

참 고 문 헌

1) 유명호. 2001. 낙동강 하류 원수 수질현황. 부산시 상수도연구보. 7, 1~54.

2) 낙동강환경관리청. 1997. '96 낙동강 수계 오염현황.

3) 공업입지센타. 1996. 공업배치 및 공장 설립에 관한 법률. pp.365

4) 국립환경연구원. 1998. 낙동강 수계에서의 남조류 독성연구 및 그 제거방안.

5) Soe J. K., Chung I. K. 1994. The phytoplankton community structure in Naktong River mouth. *Korean J. Limnol* 27, 227~250.

6) Lee J. A., Choi A. R and W. Masayuki. 1997. Taxonomic implications of the genus *Microcystis* (cyanophyceae) from the Naktong River. *Algae* 12, 123~135.

7) Kim Y. H., Choi A. R and Lee J. A. 1999. The Occurrence of Microcystins in the Naktong River. *Algae* 14, 237~246.

8) Kim B. C., Kim E. K., Pyo D. J and Heo W. M. 1995. Toxic cyanobacterial blooms in Korean lakes. *J. KSWQ* 11, 231~237.

9) 한국수자원공사. 1999. 조류독성에 관한 연구. 제11회 연구성과 발표논문집. 76.

10) 류재근, 박혜경. 1998. Cyanobacteria가 생산하는 Microcystins의 제특성 및 그 제거기술. 첨단환경기술. 52~59.

11) G. Morace., F. A. Aulicino, C. Angelozzi, L. Costanzo, F. Donadio and M. Rapicetta. 2002. Microbial quality of wastewater : detection of hepatitis A by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. of Applied Microbiol.* 92. 828~836.

12) 정용석. 2001. 총세포배양법과 ICC-PCR 그리고 수돗물 바이러스 및 분포실태. 상수도 수질개선 대책 세미나집. 83~107.

13) P. W. Huang, D. Laborde., V. R. Land., D. O. Matson., A. W. Smith and X. Jiang. 2000. Concentration and detection of calciviruses in water samples by reverse transcription-PCR. *Appl. and Environ. Microbiol.* 66, 4383~4388.

14) Abbaszadegan M., M. S. Huber., C. P. Gerba and I. L. Pepper. 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl. and Environ. Microbiol.* 59, 1318~1324.

15) 정현미. 1998. 수돗물의 엔테로바이러스-분석의 문제점과 대처방안. 수자원환경 테마 세미나집. 45~58.

16) 신영오. 1998. 엔테로바이러스와 위생관리기술. 수자원환경 테마

세미나집. 97~102.

17) 정현미. 1998. 미생물의 수처리와 수질관리 동향 및 개선방향. 수도협회지, 25. 36~54.

18) EPA. 1996. ICR Microbial Laboratory Manual.

19) 정용석. 1999. 수인성 바이러스의 수계환경내 분포실태 및 검색 방법. 수자원환경. 41~49.

20) M. Puig., J. Jofre., F. Lucena., A. Allard., G. Wadell and R. Girones. 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted water by nested PCR amplication. *Appl. and Environ. Microbiol.* 60, 2963~2970.

21) APHA. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th eds., APHA-AWWA-WPCF, New York.

22) Benson, D. A., M. S. Boguski, D. J. Lipman and J. Ostell. 1997. Genbank. *Nucleic Acids Research* 25, 1~6.

23) Castenholz R. W., 1989. Culturing method for cyanobacteria. *Methods in Enzymoogy* 167, 68~93.

24) Makoto S, Akio O, Takaki S, Seiichiro M and Takuya S. 1991. Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures (cyanobacteria). *Appl. and Environ. Microbiol.* 57, 1241~1245.

25) Makoto S, Katsumi M, Akio O, Yoshichika T, Tokujiro A and Masayasu N. 1989. Development of solid medium for growth and isolation of axenic *Microcystis* strains (cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2569~2571.

26) Neilan, B.A., P.T. Cox, P. R. Hawkins and A.E. Goodman. 1994. 16S ribosomal RNA gene sequence and phylogeny of toxic *Microcystis* sp.(Cyanobacteria). DNA Sequence 4, 333~337.

27) Takamara N and Watanabe M. M. 1987. Seasonal changes in the biomass of four species of *Microcystis* in the Lake kasumigaura. *Japan Journal Limnology* 48, 139~144.

28) Watanabe M, Oishi S. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. and Environ. Microbiol.* 49, 1342~1344.

29) Watanabe M, Kasai F. 1985. NIES-collection list of strains. 75~76, 4th eds., National Institute for Environmental Studies.

30) Yagi O, Okada M, Sudo R, Hagiwara T and Takamura Y. 1981. Growth characteristics of *Microcystis*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud.. 25, 47~58.

31) B. M. Neilan., D. Jacobs and A. E. Goodman. 1995. Genetic

Diversity and phylogeny of Toxic Cyanobacteria Determined by DNA polymorphisms within Phycocyanin Locus. *Appl. and Environ. Microbiol.* 61, 3875~3883.

32) Choi, C. W., J. M. Koo., S. A. Yoo. and S. H. Park. 2000. Diversity of Repetitive Sequences in Toxigenic Cyanobacteria Detected by Repetitive Oigonucleotides-Primed PCR. *Korean. J. Limnol.* 33, 206~212.

33) U. Nabel., F. Garcia-Pichel and G. Muyzer. 1997. PCR primers to Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.* 63, 3327~3332.

34) 박홍기. 1998. 낙동강 수질에 미치는 식물플랑크톤의 영향 및 *Microcystis aeruginosa*의 무균분리. 부경대학교 석사학위논문.

35) Yagi O, Sudo R, 1981, Isolation of *Microcystis*. Res. Rep. Nat. Inst. Environ. Stud., 25, 7~15.

36) Shin J. K and Cho K. J. 1997. Distribution and population dynamics of *Microcystis*(Cyanophyta) in Naktong River. *Algae* 12, 283~290.

37) 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.

38) 박혜경, 천세억, 박승익, 이문호, 류재근. 1992. 국내 주요 댐호에 있어서의 계절별 조류종 천이. 한국수질보전학회지 8, 150~158.

39) 박혜경. 1998. 한국산 남조류 *Microcystis* spp.의 생리·생태적 연구. 경북대학교 박사학위논문.

40) 박원훈. 1991. 호수 만입부에서의 조류 대량 증식 제어기술 개발. 과학기술처 보고서, 45~46.

41) Cho, K. S, B. C Kim, W. M Heo, S. J Cho, 1989, The sucession of phytoplankton in Lake Soyang, *Kor. J. Lim,* 22, 179~189.

42) Roma K. R. 1985, Controlling algae in water supply impoundments. J. AWWA. 77. 41~43.

43) Minear, R. A and G. L. Amy. 1995. Disinfection By-Products in Water Treatment, Lewis Publishers.

44) Barrett P. R. F., JC Curnow and JW Littlejohn, 1996, The control of diatom and cyanobacterial blooms in reservoirs using barely straw. *Hydrobiologia* 340, 307~311.

45) 박혜경, 정원화, 이수형, 권오상, 1996, Copper-Citrate 투여시기에 따른 조류 증식 억제효과. 대한환경공학회지, 18, 25~31.

46) 김응호, 강선균, 1993, 남조류 *Microcystis aeruginosa*의 증식에 미치는 중금속의 영향. 한국수질보전학회지, 9, 193~200.

47) 임병진, 정원화, 변명섭, 전선옥, 2000, 식물체를 이용한 조류증식 억제효과. 한국육수학회지, 33, 136~144.

48) 최식영. 1998. 안동대학교 산학연 제3차년도 사업실적 보고서(특허출원).

49) Shirai M., A Ohtake., T Sano., Matsumoto S., Sakamoto T., Sato A., and Aida T., Harada K-I., Shimada T., Suzuki M. and Nakano M. 1991, Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures, *Appl. and Environ. Microbiol,* 57, 1241~1245.

50) Abbaszadegan, M., P. Stewart and M. Lechevallier. 1999. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65. 444~449.

51) Abbaszadegan, M., M. S., Huber, C. P. Gerba and I. L. Pepper. 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl. and Environ. Microbiol.* 59. 1318~1324.

52) APHA. 1997. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA-AWWA-WPCF, New York.

53) C. D., Chapron, N. A., Ballester, J. H., Fontaine, N. F. Christine and A. B., Margolin. 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses and adenovirus type 40 and 41 in surface waters collected and evlauated by the information collection rule and integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. and Environ. Microbiol.* 66. 2520~2525.

54) Cho, H. B., S. H. Lee, J. C. Cho and S. J. Kim. 2000. Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Can. J. Microbiol.* 46. 417~424.

55) Cho, Y. H., C. H. Lee. 2002. Detection of Poliovirus in Water by Cell Culture and PCR Methods. *The Korean J. of Microbiology.* 38. 198~204.

56) EPA. 1995. Information Collection Requirements Rule Protozoa and Enteric Virus Sample Collection Procedure.

57) Jung, E. Y., K. L. Jang. 2000. An Effective Method for the Con centration and Detection of Enteroviruses from Water Samples by Combined Cell Culture-Polymerase Chain Reaction. *Korean J. of Life Science.* 10. 368~373.

58) Jung, E. Y., J. M. Jung, J. I. Ryoo, P. S. Shin, H. K. Jun and K. L. Jang. 2000. Detection of Enteroviruses from Surface Water by Combined Cell Culture-PCR. *Korean J. of Life Science.* 10. 484~489.

59) Jung Y. S. 2000. National survey research and significance from ICR method. *Forum collection of waterborne viral analysis.* 21~39.

60) K. A., Reynolds, C. P. Gerba and I. L. Pepper. 2001. ICC/PCR detection of infectious enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Can. J. Microbiol.* 47. 153~157.

61) K. A., Reynolds, C. P. Gerba, and I. L. Pepper. 1996. Detection of enteroviruses by an integrated cell culture PCR procedure. *Appl. and Environ. Microbiol.* 62. 1424~1427.

62) Lee, S. H., S. J. Kim. 2002. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Wat. Res.* 36. 248~256.

63) Ministry of Environment. 2002. Standard for Drinking Water Treatment.

64) Ministry of Environment. 2002. Standard Method for the Drinking Water Quality.

65) National Institute of Environmental Research. 1998. Water Quality Management for Health and Treatment related microorganisms.

66) N. Tani, K. Shimamoto, K. Ichmura, Y. Nishii, S. Tomita and Y. Oda. 1992. *Wat. Res.* 26. 45~48.

67) OECD. 1982. Eutrophication of Waters ; Montoring, Assesment and Control. 154. Paris.

68) Wallis, C and J. L. Melinick. 1960. Cationic stabilization a new property of enterovirus. *Virology.* 16. 683~700.

69) Water Quality Institute of Busan Metropolitan City. 2000. Distribution of Viruses in Tap Water.

70) Waterworks Research Institute of Seoul Metropolitan Governm ent. 2000. A Study on the control and distribution of viruses in Tap Water.

71) Waterworks Research Institute of Seoul Metropolitan Government. 1997. Research on expansion plan of water quality test items.

72) WHO. 1996. Guidelines for Drinking-Water Quality.

73) Yolken, R. H., Torsch, V. M. 1980. Enzyme-linked immunosobant assay for detection and identification of coxsachie B antigen in tissue cultures and clinical specimens.

J. Med. Virol. 6. 45~52.

74) EPA. 1991. Guidance manual for compliance with the filteration and disinfection requirements for public water systems using surface water sources.

75) Chick H. 1998. An investigation of the laws of disinfection. *J. Hygiene.* 8. 92.

76) 정현미, 윤제용. 1994. 미국 음용수의 미생물학적 기준에 관한 고찰. 수질보전학회지. 10. 62~71.

77) 박중연. 1994. 음용수 및 원수중의 바이러스. 대한상수도학회. 385~401.

78) V. A. Maarchais, B. H. Robertson, V. Aubineau. 1995. Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. *Appl. and Environ. Microbiol.* 61. 3977~3980.

79) 박중연. 1994. 수돗물의 미생물학. 대한상수도학회. 서울. 109~110

80) H. Bach, S. Tarre and M. Green. 1998. Post treatment of groundwater denitrification fluidized bed reactor effluents to achieve drinking water quality. *J. Industrial Microbiol. & Biotechn.* 20, 354~359.

81) 류동춘. 1997. 오존 및 입상활성탄을 이용한 정수공정의 최적화. 부경대학교 환경공학 박사학위 논문.

82) 日本水道協會. 1985. 日本上水道試驗方法. 630~637.

83) Rice, R. G. and C. M. Robson. 1982. Biological Activated Carbon. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.

84) 長澤. 1990. 粒狀活性炭表層のおける微生物の動向. 第41回 全國水道研究發表會 proceedings. 1~3.

85) Fuhrman, J. A. and F. Azam. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterio-plankton production in marine surface waters : Evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66. 109~120.

86) Parsons, T. R., Y. Maita and C. M. Lalli. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon, New York.

87) Bell, R. T., G. M. Ahlgren and I. Ahlgren. 1983. Estimating bacterioplankton production by the [^{3}H] thymidine incorporation in a eutrophic Swedish Lake. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 45, 1709~1721.

88) Krieg, N.R and J.G Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilins. Baltimore.

89) Rigway, H .F. and B. H. Olsan. 1981. Scanning electron microscope evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 41,

274~287.

90) 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. and Environ. Microbiol.* 46. 619-624.

91) Servais, P., G. Billen, C. Ventresque and G. P. Bablon. 1991. Microbial activity in GAC filters at the Choisy-Roi treatment plant. J. AWWA., 75, 62~68.

92) 金周永. 1995. 生物活性炭による水道原水の高度處理に關する硏究. 日本 東北大學校 博士 學位論文.

93) Stewart, M.H., R.L. Wolfe and E.G. Means. 1990. Assessment of bacteriological activity in carbon treatment of drinking water. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 56, 3822.

94) Robeck, G. Clarke N. A and Dostal K. A. 1962. Effectiveness of water treatment processes for virus removal. Journal American waterworks.

95) K. A. Reynolds, C. P. Gerba and I. L, Pepper. 1996. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 62, 1424~1427.

96) M. D. Sobsey. 1989. Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfectants in water by

disinfectants. *Wat. Sci. Tech.* 21. 179~195.

97) Langlais, B. Ozone in water treatment : Application and Engineering. Lewis publishers INC. 218~237.

98) EPA. 1999. Alternative disinfectants and oxidants guidance manual.

99) C. P. Gerba, D. M. Gramos and N. Nwachku. 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by uv light. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 68, 5167~5169.

100) EPA. 1998. Compliance Dates for the stage 1 D/DBP Rule.