

# 한강 상수원에서 수중 분원성 바이러스의 분포 특성

## Identification of Enteric Viruses in Han River Water Sample by Cell Culture and PCR

김세철 · 윤태호 · 이옥재 · 이목영 · 한선희 · 안승구\*

서울시상수도연구원, \*서울시립대학교 환경공학과

### 1. 서론

사람의 장관바이러스들은 감염된 사람의 분변에 약  $10^6 \sim 10^9$  particles/g 가량 존재하며 분변을 통해서 배출되고 직·간접적으로 음용수로 사용되는 원수를 오염시키게 된다. 특히 지표수와 지하수는 다양한 경로로 분변오염이 되고 있고, 서울의 수도물 원수로 사용되는 한강 역시도 바이러스에 오염되어 있으며, 바이러스는 모양과 크기 그리고 분포와 성상에서 다양한 차이를 보인다. 물의 바이러스 발견의 예는 국내외에서 많이 보고되고 있어 환경 문제이면서 동시에 보건상의 문제점을 제기한다. 따라서 상수원에서 바이러스에 대한 안전성 확보와 바이러스 분포경향은 매우 중요한 문제이다.

현재 미국 환경청(Environmental Protection Agency, USEPA)은 1998년 미생물 10종과 50종의 화학물질을 오염물질 후보목록 1(Contamination Candidate List, CCL)으로 발표한 이후, 2008년에 CCL 3를 준비하고 있다. 많은 나라에 원인 불명의 수질오염사고 원인이 존재하고 있으며, 수질관리를 위해 바이러스 처리 대책을 연구하고 있다. EU에서도 음용수를 통해서 바이러스감염체가 전파될 위험성이 없다는 것을 보장할 수 있도록, 음용수 안에는 사람의 장바이러스가 존재해서는 안된다고 규정하고 있다(EEC, 1976).

우리나라에서도 2002년 “정수처리에관한기준(환경부, 2002)”이 제정되어 바이러스에 관한 기준이 설정되었다. 이 법에서는 제거목표를 99.99%이상으로 설정하고, 이를 달성하기 위해 미국의 지표수처리법과 매우 비슷한 방식을 취하고 있다. 먹는물 확대방안에 의하여 세분화된 실태조사를 2007년 7월부터 실시하고 있다.

상수원수에서 바이러스 오염수준을 파악하는 것은 환경에 존재하는 바이러스를 정확하게 인식함과 동시에, 정수처리공정의 제거목표를 설정하는데 가장 기본이 되며, 바이러스 오염원 추적 등에 도움을 주어, 오염원의 제거 및 제어대책 준비에 가장 중요한 자료가 될 수 있으므로 중요하다.

유전자분석법에 의한 바이러스 분석법은, 원수 중 유전자분석에 의해 검출된 바이러스의 특성과 정확한 원인바이러스의 구명 및 공시세포에 의한 검출이 어려운 바이러스의 분포정도를 파악하는 데 유용한 방법이라 할 수 있다.

따라서 본 연구는 상수원수의 오염수준과 정수처리에 의한 제거수준을 파악하여 하고자 하였으며, 세포배양법 및 유전자분석법을 병용하여 상수원수에서의 바이러스 분포특성을 파악하며 궁극적으로 수인성질병의 감염으로부터 안전한 수도물 관리에 도움이 되고자 함에 목적을 두었다.

### 2. 실험재료 및 방법



Figure 1. Water sampling sites.

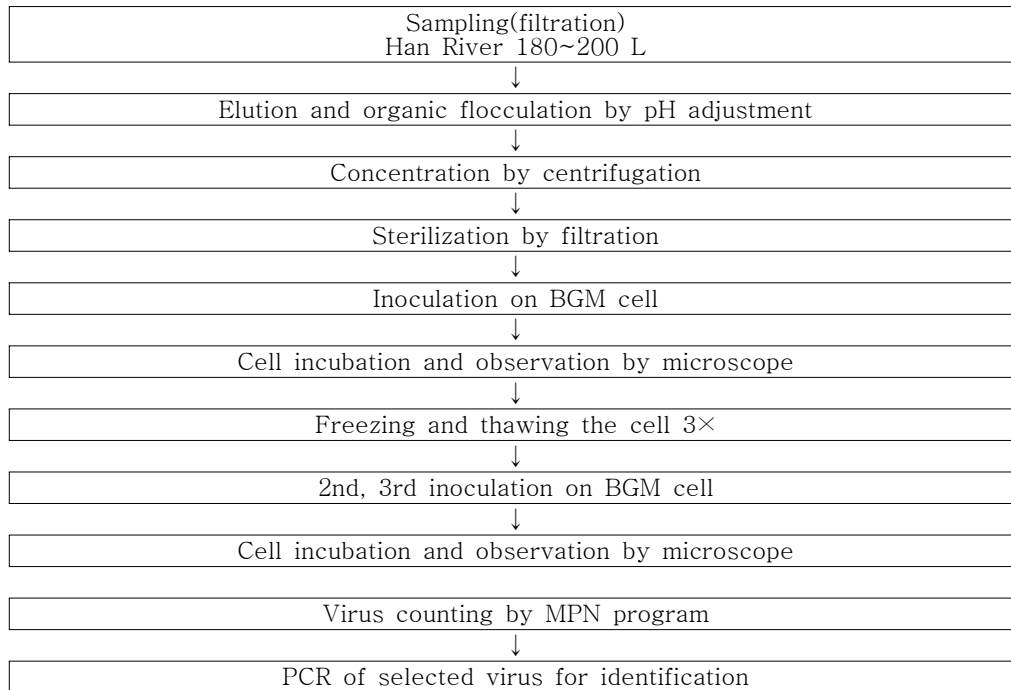


Figure 2. Outline of method used to detect of enteric virus.

#### 바이러스 시료채취 및 분석

본 연구에서 바이러스 분포를 조사하기 위한 시료는 팔당댐으로부터 잠실 수중보 사이의 4개 취수장에서 채취하였다(Figure 1). 총배양가능바이러스 농도 분석을 위한 시료채취, 농축, 순화 및 분석법 전반적인 개요를 요약하면(Figure 2)와 같다. 시료 채취는 정수처리기준에 정하고 있는 바이러스 표준분석방법에, 표준분석방법 규정 이전에는 ICR Microbial Laboratory Manual(USEPA, 1996a)에 따랐다.

검출에 사용한 양성대조군 약독화된 폴리오바이러스 type III(ATCC VR-63, 폴리오바이러스 III LH, ATCC VR-193, 폴리오바이러스 III Fox), 아데노바이러스 41(ATCC VR-930)은 HeLa(ATCC CCL-2) 레오바이러스는 레오바이러스 type 1(ATCC VR-230, Lang  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml), 레오바이러스 type 2(ATCC VR-231, D5  $10^{6.38}$  TCID<sub>50</sub>/ml), 레오바이러스 type 3(ATCC VR-232, Abney,  $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml)는 세포미국균주은행(American type culture collection)에서 구입하였다.

RNA 준비(QIAamp Viral RNA mini kit, QIAGEN, Germany)는 제시된 실험법에 따라 RNase를 불활성화 시키고, 모든 과정은 빠르게 실온에서 실행하였으며, 아데노바이러스 DNA추출은 High PCR

Table 1. Primers used for this study.

Primer	sequence	site
<b>Enterovirus</b>		
Entero 1(EV-L)	5'-CCT CCg gCC CCT gAA Tg-3'	196bp
Entero2(EV-R)	5'-ACC ggA Tgg CCA ATC CAA-3'	
<b>Adenovirus</b>		
Adeno 40 hexAA1885	5'-gCC gCA gTg gTC TTA CAT gCA CAT C-3'	300bp(18858-18883)
Adeno 41 hexAA1913	5'-CAg CAC gCC gCg gCT gTC AAA gT-3'	19136-19158)
Adeno 2 nehexAA1893	5'-gCC ACC gAg ACg TAC TTC AgC CTg-3'	142bp (18937-18960)
Adeno 2 nehexAA1905	5'-TTg TAC gAg TAC gCg gTA TCC TCg Cgg TC-3'	19051-19079)
<b>Reovirus</b>		
S2-26	5'gCg CTg CTg TCC TAT TCA AgA CT-3'	538bp
S2-563rev	5'-TAg TTC ATg AgA AgC Tgg TTC AC-3'	Reovirus S2 gene 26-563

Table 2. Distribution of enteric virus by PCR and TCVA in Hanriver.

Flasks	PCR				TOTAL	
	Entero(A)	Adeno-nested(B)	Reo		PCR(D)	Cell Culture (1+2psg)
			1st	2nd(C)		
40	17/40	6/40	19/40	22/40	30/40	30/40
	42.5%	15%	47.5%	55%	75%	75%

template preparation kit(Boehringer Mannheim, USA)을 이용하여 바이러스 DNA을 준비하였다.

### 바이러스 유전자분석

1) 장바이러스 RT-PCR은 DeLeon *et al.*, 1990 조건 2) 아데노바이러스분석 Puig(1994) 등의 방법을, 레오바이러스 유전자 분석은 Muscillo 등(2000)의 방법에 따라 사용하였다(Table 1). 증폭된 fragment의 염기서열을 분석하기 위해 TOPO TA cloning(Invitrogen, USA)을 사용하였으며 plasmid DNA를 추출하였다(QIAGEN Inc.). M13 forward와 reverse primer를 사용하였고, Bigdye(ABI)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 각각을 핵산정보 비교 프로그램을 이용하여 분석하고(DNAStar, Clustal W method), GenBank 자료와 상동성을 비교하였다.

### 3. 결과 및 고찰

정수장중 상대적으로 상류에서 공급하는 광암(KA)과 하류에 위치하는 구(KU)의, 자양(JY), 풍납원수(PN)를 연구대상으로 하였으며 2002년 4월에서 6월까지 원수 4점의 시료를 선택하여 분석한 바 JY02-05, PN02-06시료는 세포배양시 다양한 세포병변효과를 나타내었다. 첫 번째 접종시료에서는 2주 배양시까지도 세포병변효과를 나타내지 않거나 미약한 세포변화양상을 보이며, 2차 계대세포에서도 장바이러스 보다 약한 세포변화양상을 보이고, 3차 접종시료에서는 3~5일 경과 후에 명확한 세포병변효과를 나타내었다. 장바이러스로 판단되는 시료외의 다른 시료들의 특성을 알아보기 위하여 각 첫 번째 분석시료 10개의 플라스크 시료에 대해 장바이러스, 아데노바이러스 그리고 레오바이러스의 유전자 분석 프라이머를 이용하여 유전자 분석을 하였다. 각 시료에서 2차 접종까지 명확히 세포병변효과로 분류된 모든 시료들은 장바이러스 유전자 분석에 의하여 장바이러스 양성으로 분석되었다. 그러나 나머지 장바이러스 세포병변효과와 상이한 시료들은 1개 플라스크를 제외한 모두가 레오바이러스 유전자 증폭에 의하여 양성으로 나타났다. JY02-05시료의 유전자 분석은 총 10개 시료가 양성되었고 이 중 7개는 장바이러스 세포병변효과 및 장바이러스 유전자분석 양성이었으며, 9개의 시료는 레오바이러스 유전자가 검출되었다. PN02-06시료의 경우도 2번째 계대세포에서 명확한 세포병변효과를 보인 3개의 시료는 장바이러스 유전자 분석결과 모두 장바이러스가 검출되었다. 그러나 느린 세포병변효과를 보인 7개의 시료 중 5개 시료에서 레오바이러스 유전자가 검출되었다. 1건의 시료는 장바이러스 유전자 및 아데노바이러스 유전자 그리고 레오바이러스 유전자 증폭에 의해서 검출되지 않았지만 세포병변효과로 판단되었다. 각 시료들은 장바이러스에 의하여 빠른 세포병변효과를 나타내었지만, 일부 시료는 중복으로 검출되는 바이러스들이 있었으며 이때 느리게 성장하는 바이러스는 유전자분석에 의하여 동일 플라스크 시료 내에 다른 종류의 바이러스가 공존하여 배양되었음을 확인할 수 있었다.

비교적 원수 수질이 좋았던 시료 1개와 모두 양성시료로 판정되었던 3개 시료의 세포배양법과 유전자분석법의 적용결과에 차이가 있었다. 동일 시료에 중복 감염된 시료들의 양성비율의 총합은 112.5%(A+B+C)이고, 유전자분석 총합 75%(D)를 제외하면 분석세포 및 플라스크에 37.5%가 동일 시료에 중복 감염되어 있음을 알 수 있다(Table 2). 또한 레오바이러스의 유전자분석의 경우 1차 배양에서보다 2차배양에서 높이 검출됨은 레오바이러스가 본디 서서히 성장함을 나타내는 경우로 볼 수 있었다. 3종의 유전자분석 결과, 당시 우리의 상수원에는 레오바이러스 49%, 장바이러스 38%, 그리고 아데노바이러스 13%로 분석되어, 레오바이러스가 가장 우점하고 장바이러스 그리고 아데노바이러스 순으로 분포하고 있는 것으로 나타났다(Figure 3). 다만 아데노바이러스 등에 적합한 숙주세포를 사용하지 않고 표준세포(BGMK)를 사용하였기에 세포배양이나 유전자분석에 의하여 분포가 변할 수 있는 점은 배제할 수 없는 것으로 생각되었다.

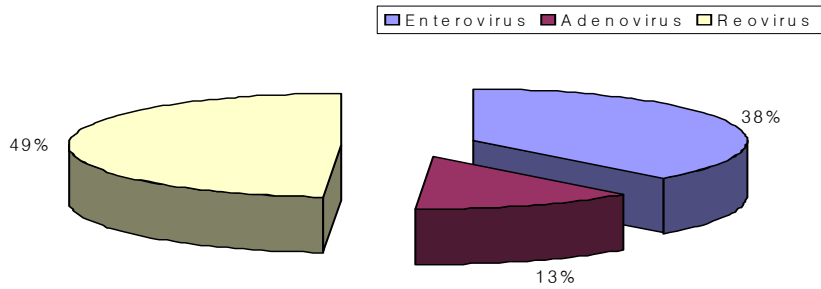


Figure 3. Identification of Viruses in Han River by PCR(3 enteric viruses).

검출된 유전자중 레오바이러스의 유전자 염기서열을 분석하여 유전자은행에서 레오바이러스임을 확인한 후, 분자적계통을 분석한 결과 유전자은행에서 얻은 레오바이러스들과 매우 다른 염기서열을 지닌 바이러스가 환경 중에 존재하고 있었다. 이는 레오바이러스(family)는 사람뿐만 아니라 다양한 숙주를 갖고 있다고 추정할 수 있겠으나 유전자은행과 비교시 레오바이러스 type 1, 3, 그리고 2 순으로 검출되었다. Milde 등(1995)은 물 시료에서 얻은 레오바이러스 RNA SDS-PAGE 전기영동에 의하여 다양한 변이성주를 관찰하였는데 이때 레오바이러스 1이 가장 많이 얻어졌고, 다음으로 레오바이러스 3가 검출되었지만 레오바이러스 2는 검출되지 않았으며 상당부분이 다른 형태를 나타내고 있었다고 보고하였으며, Matsuura 등(1993)의 물과 사람의 분변 레오바이러스의 생태 및 역학적 연구결과 사람에서 얻어지는 레오바이러스와 많은 다양성이 있었다고 보고한 바 있다.

상수원수에서 바이러스 오염수준을 파악하는 것은 환경에 존재하는 바이러스를 정확하게 인식함과 동시에, 정수처리공정의 제거목표를 설정하는데 가장 기본이 되며, 바이러스 오염원 추적 등에 도움을 주어, 오염원의 제거 및 제어대책 준비에 필요한 것으로 판단되어진다.

#### 참고문헌

환경부, 2002, 정수처리에관한기준(환경부고시 제2002-106호).

DeLeon, R., Y. S. C., Shieh, R. S. Baric, and M. D. Sobsey., 1990, "Detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples by gene probes and polymerase chain reaction" *In water quality technology conference proceedings, AWWA*, pp. 833-853.

EEC, 1976, "EEC directive 76/160 of december 8th 1975 concerning the quality of water for bathing", *J. Off. Eur. Commun*, L 31.

FR, 2004a, Drinking water contaminant candidate list 2: notice.

Matsuura, K., Ishikura, M., Nakayama, T., Hasegawa, S., Morita, O., Katori, K., Uetake, H., 1993, "Ecological studies of reovirus pollution of rivers in Toyama prefecture, II, Epidemiological study of reoviruses isolated from river water", *Microbiol. Immunol.* Vol. 37, pp.305-310.

Middle, N. T., and Botzenhart, K. 1995, "Occurrence of reoviruses in environmental water samples" *Wat. Sci. Tech.* Vol. 31, No. 5-6, pp. 363-366.

Muscillo, M. et al., 2000, "A new RT-PCR method for the identification of reoviruses in seawater samples", *Wat. Res.* Vol. 35, No. 2, pp. 548-556.

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

USEPA, 1996, *Virus monitoring protocol for the information collection requirements rule*, EPA/814-B-95-002.