

Environmental Transmission of Noroviruses and Study of Fecal Microorganisms as Viral Indicators in the Suyeong River in Busan, Korea

Seong-Hwa Choi^{1*}, Ho-Cheul Yun¹, Ju-Hee Shim¹, Kyeong-Seon Kim¹, Gee-Hyeong Park¹, Woo-gon Do¹, Eun-young Jeong² and Kyoung-Lib Jang³

¹Busan Metropolitan City Institute of Health & Environment, Busan, Korea

²Water Quality Institute, Water Works HQ of Busan Metropolitan City, Kyounghnam, Korea

³Department of Microbiology, Pusan National University, Busan, Korea

Corresponding

Seong-Hwa Choi
Busan Metropolitan City Institute of
Health & Environment, Busan, 46616,
Korea.

Phone : +82-51-309-2944

Fax : +82-51-309-2929

E-mail : csw95@korea.kr

Received : June 11, 2018

Revised : September 10, 2018

Accepted : September 11, 2018

In order to investigate the occurrence of norovirus in rivers and beaches, a total of 81 samples were tested at seven sites of Oncheon stream, Suyeong river and Gwanganri beach in Busan from January to November, 2017. To improve the detection of norovirus from sea water, we applied the inorganic cation-coated filter method which showed $48.8\% \pm 12.2\%$ (n=3) and $27.4\% \pm 6.0\%$ (n=3) recovery yields from river water and sea water inoculated with Norovirus, respectively. Norovirus was detected in a total of four samples (4.9%), which all were GII genotype. Norovirus GII was detected in three samples at two waste water treatment plants (WWTP) outlet and one sample at about 500 meter downstream from WWTP in both the winter and spring seasons. We also monitored fecal indicator organisms, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus* and coliphages [somatic coliphages (SC), male-specific coliphages (MSC)] to analyze the potential transmission of enteritis causative agent in dry and wet days. Bacterial influences were found at the site of the WWTP effluents in the dry days and spread further to the costal beach in the wet days. But no viral influences were found in the river downstream in both dry and wet days.

Key Words: Norovirus, Sea water, River water, Indicator organism, Dry days, Wet days

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Copyright © 2018 Journal of Bacteriology and Virology

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

INTRODUCTION

노로바이러스(Norovirus)는 Caliciviridae family에 속하는 27~40 nm 크기의 7.5 kb의 단일가닥 RNA 바이러스로서 6종의 유전자군(GI~GVI)으로 세분되며 (1, 2), 그 중 GI, GII, GIV 유전자군이 사람에게 감염 가능하며 전체 노로바이러스 매개 발병의 75~90%가 GII 유전자군에 의한 것으로 보고되었다 (3~5). 노로바이러스는 감염자와의 접촉(88%), 오염된 음식(10%), 오염된 물(1.5%)에 의해 주로 전파되며 전염성이 매우 강한 것으로 알려져 있다 (6). 노로바이러스는 물에서 최소 2개월간 감염성을 유지한 채 지속적으로 존재할 수 있으며 (7), 처리된 하수 (8~11), 하천 (12~15), 해수 (7, 16~18) 등 다양한 종류의 물에서 노로바이러스의 검출이 확인되었다. 또한, 폐수처리시설(water treatment plant)의 유출수, 빗물, 비점오염원에 의한 해수의 오염은 레크리에이션과 조개류 섭취 등에 의해 노로바이러스 오염을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (19).

노로바이러스와 같은 세포배양이 되지 않는 바이러스는 주로 PCR을 이용한 유전자 분석으로 그 존재 여부를 확인한다. 물에서 노로바이러스의 검출은 바이러스가 대량 증식되어 있

는 환자 분변에서의 조사에 비해 검출 민감도가 극히 낮기 때문에, 국내에서는 국립환경과학원 지하수 노로바이러스 분석지침에 따라 지하수는 500 L, 하천수는 100 L 이상 대용량의 물을 여과 농축하여 beef extract를 이용해 바이러스를 용리시키는 유기농축 방법을 채택하고 있다. 그러나, beef extract가 cDNA 합성 및 PCR 증폭을 억제하여 유전자 분석을 방해하거나 (20) 특히, 염분이 많은 시료 중 노로바이러스의 안전성은 더욱 낮아서 (12) 바이러스의 검출율을 더욱 낮출 수 있다고 알려져 있다. 따라서, 이번 연구대상 지점은 조석에 의해 염분이 변화하는 기수역(brackish water zone) 하천과 해수욕장을 대상으로 하므로 염분에 의한 영향을 적게 받으면서 소량의 시료로도 회수 효율이 높은 무기농축방식을 도입한 연구 결과 (8, 14, 16, 21, 22)를 참고하여 노로바이러스를 추출하고자 하였다.

노로바이러스는 물을 매개로 하여 먼 거리 이동이 가능하고 레저용수, 해수욕장 등을 오염시켜 바이러스성 장염발생의 우려가 있지만 부산지역 도심 하천에 대해서는 노로바이러스 연구 결과가 없는 실정이다. 따라서, 2개의 하수처리장 방류수가 상시 유입되고 있으며 강우 시에는 합류식 하수관거월류수(CSOs)와 같은 비점오염원에 의해 오염도가 증가하는 수영강 수계를 중심으로 무기농축법을 적용하여 노로바이러스 오염도를 파악하고자 하였다. 아울러, 노로바이러스와 같은 장관계바이러스와 전파방식이 유사한 대장균 파지(coliphage)와 장염지표 세균인 대장균(*Escherichia coli*)과 장알균(*Enterococcus*)의 오염 분포 특성을 파악하여 노로바이러스의 이동 가능성을 분석해 보고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

연구지점

2017년 1월부터 11월까지 부산지역 수영강 수계를 따라 광안리해수욕장으로 이어지는 7개 지점(S1~S7)에서 시료를 채취하였다(Fig. 1). 수영강은 부산지역의 대표 지방 2급 하천으로 총 길이 19.2 km, 유역면적이 198.82 km²이며, 상류는 회동 수원지로 부산시 상수원으로 이용되며 중류에서 온천천, 석대천의 지류 하천으로 이어지며 중하류에서는 수영하수처리장(1일 처리용량 452천 m³)과 동부하수처리장(1일 처리용량 135천 m³)의 최종 방류수가 유입되며 최하류인 수영만에서 광안리 해수욕장으로 이어지는 하천이다. 광안리 해수욕장은

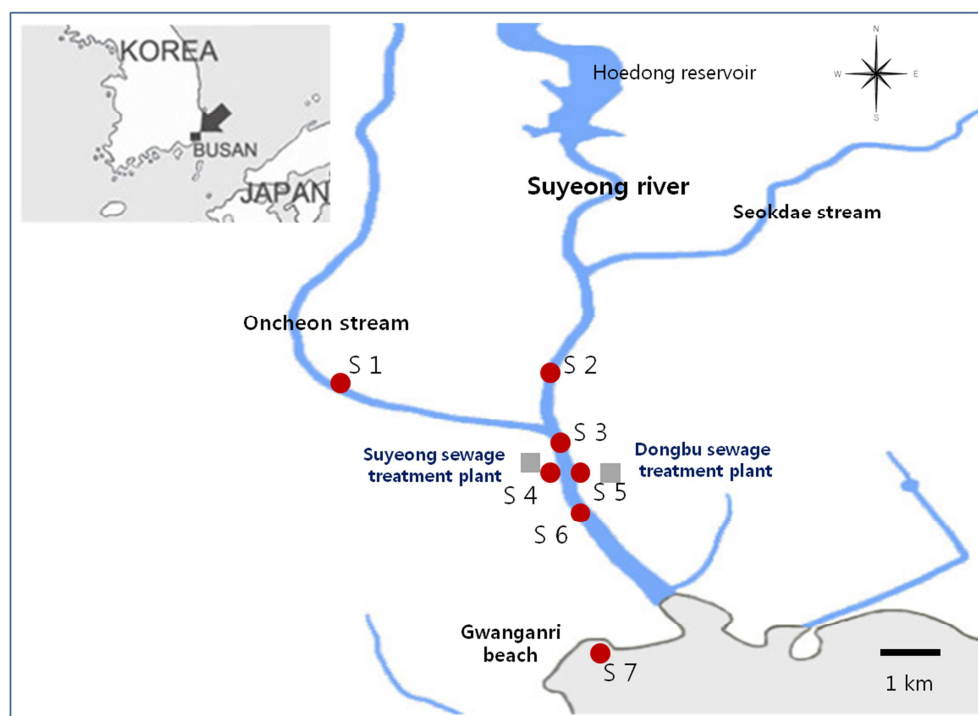


Figure 1. Location of the sample collection sites. Location of the sites in which water samples were collected was indicated as S1~S7. S, site.

부산광역시 수영구 광안 2동에 위치하며 부산을 대표하는 해수욕장이며 지리적으로 수영강 하구와 인접하고 있어 수영강 하류의 오염원의 영향을 받을 수 있는 여건을 가지고 있다. 연구대상 지점 중 S1(온천천 세병교)은 조석의 영향을 받지 않고 강우 시 주변 하수관거 월류수(CSOs)에 의한 오염을 받는 지점이며 S2~S6은 조석에 따라 염분의 변화가 있으며, S7은 수영강과 가장 인접한 광안리 해수욕장으로 채수 위치를 선정하였다.

조사일정 및 조사 횟수

시료의 채취는 2017년 1월부터 11월까지 총 13회 실시하였다. 9회는 채수 전 최소 3일 이상 강우가 없었던 날을 대상으로 한 건기(dry day) 채수였으며, 강우 영향을 보기 위해 3~7월 사이 4회는 3.0~20.0 mm 강우가 있었던 다음 날 우기(wet day) 채수를 실시하였다. 연구대상 지점 중 S1(온천천 세병교)을 제외하고는 조석에 따라 염분 농도가 변하는 지점이므로 하천의 수질 특성을 판단하기 위해 가 급적 간조 시에 시료를 채취하였다.

조사 방법

시료의 채취 및 보관은 환경부 고시 제2017-4에서 제시한 수질오염공정시험기준에 따라 수행하였다. 시료채취는 7개 지점에서 각각 표층수를 채취하였으며 현장에서 수질측정기(YSI 556MPS; YSI Environmental, Yellow Springs, OH, USA)를 이용하여 수온, 수소이온농도, 용존산소, 전기전도도, 염분을 측정하였으며, 현장에서 잔류염소와 탁도를 측정(Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA)하였다. 채수한 시료는 4℃ 이하로 보관하여 실험실로 운반하여 즉시 세균 시험을 실시하였으며 대장균 파지(coliphage) 시험은 채수 후 최대 48시간을 넘기지 않도록 하였다. 염소가 처리된 시료는 1 L 당 0.5 ml의 10% sodium thiosulfate (Merck, Darmstadt, Germany)를 첨가하여 유리 잔류염소를 제거 후 시험을 실시하였다. 강수량 자료는 부산 기상청 해운대측정소 자료를 활용하였으며 조석정보는 국립해양조사원 자료를 참고하였다.

대장균과 장 구균 검사

대장균과 장알균의 검출은 해양수산부 훈령 제139호에서 제시한 해수욕장 수질기준 운용지침에 따라 효소이용 정량법으로 다음과 같이 실시하였다. 시료를 멸균 인산완충희석액(pH 7.2)으로 1, 10, 100배 희석하여 혼합한 후 최종 부피가 100 ml가 되도록 하여 Colilert (IDEXX, Westbrook, ME, USA)을 넣어 혼합한 후 정량 분석용 트레이(Quanti-tray; IDEXX)에 넣고 기포를 제거한 후 PQ Sealer (IDEXX)를 이용하여 트레이를 봉하고 대장균은 $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 18~24시간, 장알균은 $41 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 24~28시간 배양 후 암실에서 365 nm의 자외선 램프(Spectroline CM-10A; Spectronics corporation, Westbury, NY, USA)를 조사하여 형광이 나타난 웰(well)을 계수하여 제조사에서 제시하는 최적확수표에 따라 정량하였다. 실험오차를 줄이기 위해 동일한 시료 희석액을 3배수씩 시험하였다. 시험조작 시 마다 별도로 멸균 인산완충희석액 100 ml를 취하여 동일 과정으로 바탕 시험을 수행하였다.

대장균 파지(coliphage) 검사

대장균 파지를 검사하기 위하여 항생물질이 첨가된 25 ml tryptic soy broth (Beckton Dickson, Sparks, MD, USA)에 숙주 세균을 0.5 ml 접종하여 대수증식기가 될 때까지 37℃에서 4시간 배양하였다. 대장균 파지 종류에 따른 숙주 세균과 첨가한 항생물질의 종류는 Table 1과 같다. 항생제가 첨가된 멸균된 100 ml의 2 x tryptic soy agar (Beckton Dickson) 배지에 채취 시료 50 ml를 넣고 잘 섞은 뒤 멸균된 4 M MgCl_2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.25 ml 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후 배양해 놓은 숙주 세균을 100 μL 씩 첨가한 후 평판 배양하였다. 37℃에서 24시간 배양한 후 대장균 파지가 숙주세포를 공격하여 생긴 투명한 플라크를 개수하였다.

바이러스의 농축

기수역 하천 및 해수 농축은 Gentry 등 (13)과 Katayama 등 (16)이 제시한 양이온 멤브레인(0.45 μm pore)을 사용한 방법을 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 부유물이 있는 하천수 및 해수 2 L를 GF/C (1.2 μm pore; GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) 필터로 전여과하였다. HA membrane (0.45 μm pore size, 90 mm diameter; Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Germany)을 멸균 여과컵(LK Lab, Namyangjusi, Gyeonggi-do, Korea)에 장착한 후 250 mM AlCl_3 10 ml를 넣고 약 1~2분 경치한 후 15~20 psi로 감압 여과하여 Al^{3+} 양이온 필터를 만들었다. Al^{3+} 양이온 필터로 전여과한 시료를 분당 100 ml의 속도로 15~20 psi 정도로 천천히 여과하여 필터에 바이러스를 부착시킨 후, 0.5 mM H_2SO_4 (pH 3.0; Acros Organics, Geel, Belgium) 100 ml를 여과하여 양이온을 제거하였다. 1 mM

Table 1. Characteristics of host cells of coliphages

Coliphage strain	Host bacteria strain	Antibiotics
Somatic coliphage (X174)	<i>E. coli</i> Famp [<i>Escherichia coli</i> Famp]	Ampicilin/streptomycin sulfate (1.5 mg/ml)
Male-specific coliphage (MS2)	<i>E. coli</i> C [<i>Escherichia coli</i> C]	Nalidixic acid (10 mg/ml)

Table 2. The sequences of oligonucleotides used for the detection of norovirus

Genogroup	Primer	Primer sequence (5'-3')	Position	Product size (bp)	Reference
Norovirus GI	GI-F1M	CTGCCCCGAATTGTAAATGATGAT	5342	314	23
	GI-R1M	CCAACCCARCCATRTACATYTG	5671		
	GI-F2	ATGATGATGGCGTCTAAGGACGC	5357		
Norovirus GII	GII-F1M	GGGAGGGCGATCGCAATCT	5058	313	
	GII-R1M	CCRCIGCATRICRTRTACAT	5401		
	GII-F3	TTGTGAATGAAGATGGCGTCGART	5088		

NaOH (pH 10.5~10.8) 10 ml를 첨가하여 1분간 정치 후 여과시켜 필터에 부착된 바이러스를 용출하여 회수하였다. 회수된 시료를 50 mM H₂SO₄ 50 µl와 100 × Tris-EDTA buffer (pH 8.0) 50 µl를 넣어 중화하여 안정화시킨 후, Centriprep[®] YM-50 tube (Merck Millipore Ltd.)를 사용하여 1500 × g에서 10분간 원심분리한 후, 다시 2분간 원심분리하여 추가 농축하여 최종 1 ml 시험용액으로 농축하였다. 바이러스 농축 시험용액은 핵산추출 전까지 -20℃에 보관하였다.

바이러스 정량 분석

바이러스 농축 시료에서 RNA 추출은 Viral nucleic acid extraction kit (Green Mate Biotech, Seoul, Korea)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 최종 농축액 150 µl에 Lysis & Binding buffer 300 µl를 넣고 진탕하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 magnetic bead 20 µl를 넣고 진탕한 후 10분간 반응시켰다. Magnetic stand에서 30초간 정제시키고 상층액을 제거한 후 Wash solution I 400 µl를 넣고 10초간 진탕하여 섞어주었다. Wash solution II, Wash solution III로 각각 동일한 방법으로 세척을 진행한 후 magnetic stand에서 정제시켜 상층액을 완전히 제거한 후 Elution buffer 100 µl를 넣었다. 5분간 반응시킨 후 60℃ heat block에서 10분간 정제시키고, magnetic stand에서 30초간 정제시킨 후 상층액을 수거하여 cDNA 합성을 위한 추출 RNA로 사용하였다.

RNA 추출액 10 µl를 Norovirus Real-Time RT-PCR kit (Genotech, Daejeon, Korea)를 이용하여 50℃에서 30분간 역전사반응을 실시하여 cDNA를 합성한 후, 95℃에서 15분간 초기 denaturation을 시키고, 95℃ 15초 denaturation과 56℃ 1분 annealing과 extension 과정을 45 cycle 반복하였다(ABI 7500 Fast; Applied Biosystems Instrument, Foster City, CA, USA). PCR 반응에 사용한 primer는 Table 2와 같다.

RNA 추출액 중 노로바이러스의 정량 분석을 위한 표준 검량선은 노로바이러스 GII Genomic RNA (10⁵ copies/µl; Genotech)를 10¹~10⁵까지 단계 희석한 후 상기 조건과 동일한 조건으로 real-time RT-PCR을 실시하여 작성하였다. 단계 희석하여 얻은 Ct 값을 플로팅하여 작성한 표준 곡선을 사용하여 바이러스 copy 수로 변환했다. 표준 곡선의 기울기는 -3.682, y 절편은 41.959 및 R²는 0.998이었다.

양성 분변 부유액을 이용한 회수율 확인

Al³⁺ 양이온 코팅 여과 및 Centriprep[®] YM-50 농축 방법의 회수 효율을 확인하기 위해 강우 등 특이사항이 없는 날을 택하여 S7 지점

Table 3. Recovery of Norovirus from natural seawater and stream water spiked with Norovirus GII

Sample	Initial concentration (total 300 mL water) viral copies/ml	Recovered concentration (total 1 mL concentrate) viral copies/ml	Recovery rate ^a (%±SD)
Seawater ^b	6.9×10^4	$1.9 \pm 0.4 \times 10^4$	27.4 ± 6.0
Stream water ^b	6.9×10^4	$3.4 \pm 0.8 \times 10^4$	48.8 ± 11.2

^a Recovery rate (%) = (Recovered viral concentration × vol / Spiked viral concentration × vol) × 100^b Seawater and stream water were sampled from S7 and S1

해수와 S1 지점의 하천수를 각각 무균 채수병에 4 ℓ씩 채수하였다. 채수 시료 중 300 ml씩을 취하여 노로바이러스 GII로 확인된 분변 부유액(6.9×10^4 copies/μl)을 300 μl 넣고 20℃에서 24시간 천천히 교반한 후 전술한 방법으로 노로바이러스를 여과 농축하여 바이러스를 분석하였다. 아울러, 채수한 시료 중 노로바이러스 오염 여부를 확인하기 위해 시료 2 ℓ를 취하여 동일한 방법으로 분석하였다.

공간분석방법

건기와 우기의 지표 미생물의 공간 오염도를 분석하기 위하여, 관측값 간의 공간적인 상호관계는 관측값 간의 이격거리를 기준으로 자료 간의 거리에 따른 이질성을 나타내는 반분산(semi-variogram)을 이용하고 반분산에 의한 공간적 자기상관정보를 가중치로 이용하여 이웃한 관측값의 선형조합으로 미관측 지점의 값을 추정하는 Kriging법으로 분석하였으며, 분석은 Surfer 13 (Golden Software LLC, Golden, CO, USA)을 활용하여 실시하였다.

통계학적 유의성 검증

수집된 자료의 계절별 차이를 확인하기 위하여 일원배치 분산분석법(one-way ANOVA)으로 분석하였고, 여름과 겨울철 및 건기와 우기 간의 유의성의 차이는 *t*-test로 분석하였으며, 분석은 SPSS 17.0 (IBM, Armonk, NY, USA)을 활용하여 실시하였다.

RESULTS

자연시료를 이용한 바이러스의 회수 효율

노로바이러스가 확인되지 않은 자연 해수와 자연 하천수에 노로바이러스를 접종한 다음 여과 농축한 결과, 해수 시료에서는 출발 농도 6.9×10^4 copies/ml로부터 $1.9 \pm 0.4 \times 10^4$ copies/ml가 회수되어 회수 효율은 $27.4 \pm 6.0\%$ ($n = 3$)이었으며 하천수에서는 $3.4 \pm 0.8 \times 10^4$ copies/ml가 회수되어 회수 효율은 $48.8 \pm 11.2\%$ ($n = 3$)로 평가되었다. 회수율 시험은 3회 실시하였으며 처음 접종한 바이러스의 양을 100%로 하여 회수율을 구하였다(Table 3).

노로바이러스 검출 특성

연구대상으로 한 하천과 해수욕장의 노로바이러스 검출 특성을 파악하기 위해 7개의 조사지점을 대상으로 2017년 1월부터 11월까지 총 13회(건기 9회, 우기 4회) 채수를 실시하여 81건의 시료를 대상으로 시험한 결과 노로바이러스는 2월에 2건, 5월에 1건, 11월에 1건 총 4건(4.9%)이 검출되었으며 4건 모두 노로바이러스 유전자군은 GII로 확인되었다. 수영하수처리장 방류구(S4)에서 1회, 동부하수처리장 방류구(S5)에서 2회 그리고 두 하수처리장 방류구에서 500 m 가량 하류인 수영강 좌수영교(S6)에서 노로바이러스가 1회 검출되었으며 수영강 하류에서 이어지는 광안리해수욕장(S7)에서는 노로바이러스가 전혀 검출되지 않았다. 수계 중 노로바이러스는 계절적으로 노로바이러스 설사 환자가 많은 겨울과 봄에 검출되었으며, 노로바이러스가 검출되었을 때 다른 장염지표 세균 및 대장균 파지도 동시에 고 농도로 검출되는 것을 확인하였다. 2월에 검출된 S4와 S6의 노로바이러스 농도는 각각 6.8×10^6 copies/100 ml과 1.1×10^4 copies/100 ml를 나타내었으며, S4에서 방류된 바이러스가 S6에서 일부 희석되어 나타났다가 수영강 하류를 지나 S7에서는 노로바이러스가

Table 4. Parameter characteristics of norovirus (NoV) GII positive samples

Sampling site time	Temp (°C)	pH	DO (mg/l)	Salinity (PSU)	Turbidity (NTU)	NoV (copies/100 ml)	<i>E. coli</i> (MPN/100 ml)	Enterococcus (MPN/100 ml)	Coliphage (PFU/100 ml)	
									SC	MSC
S4 Feb 17	12.8	8.1	6.8	0.62	1.62	6.8×10^6	4.1×10^3	1.4×10^3	3.5×10^2	2.4×10^1
S6 Feb 17	10.5	7.2	12.5	18.60	2.53	1.1×10^4	1.5×10^3	6.3×10^2	1.2×10^2	1.4×10^1
S5 Mar 17	20.4	6.8	8.7	0.92	1.53	5.7×10^3	7.3×10^3	8.0×10^2	6.9×10^3	5.8×10^1
S5 Nov 17	16.7	7.2	8.7	1.11	2.02	7.9×10^3	3.0×10^4	1.4×10^4	9.1×10^3	1.6×10^1

Temp, Temperature; DO, Dissolved oxygen; PSU, Practical salinity unit; NTU, Nephelometric turbidity unit; NoV, norovirus; *E. coli*, *Escherichia coli*; MPN, most probable number; PFU, plaque forming unit; SC, Somatic coliphage; MSC, Male-specific (F⁺) coliphage; S, Site

확인되지 않았다. 대장균 파지와 장염유발 지표세균의 분포 역시 노로바이러스 검출지점에서 고농도로 나타났다가 하류에서 농도가 낮아진 것을 확인할 수 있었다. 5월에 검출된 S5의 노로바이러스는 상대적으로 낮은 농도(5.7×10^3 copies/100 ml)가 확인되었으며 그 이후 지점에서는 전혀 검출되지 않았다. 11월에 검출된 S5의 노로바이러스는 7.9×10^3 copies/100 ml 수준이었으며 그 이후 지점에서는 검출이 확인되지 않았다(Table 4).

조사지점의 수질 및 지표 미생물 분포 특성

7개의 조사지점을 대상으로 2017년 1월부터 11월까지 총 13회(건기 9회, 우기 4회) 채수를 실시하여 계절적 이화학적 수질 및 지표 미생물 분포 특성을 살펴보았다. 봄은 3, 4, 5월, 여름은 6, 7월, 가을은 9, 10, 11월, 겨울은 1, 2월을 대상으로 하였으며, 봄과 여름에는 강우 후 조사 각각 2회씩 조사한 결과를 포함하였다.

조사지점의 세균과 바이러스의 생존에 중요한 인자인 수온과 용존산소는 기온의 변화에 따른 정상적인 하천과 해수의 수준이었으며 염분은 조석시간을 고려하여 채수한 결과 11.56~14.07(평균 13.10) psu로 급격한 염분의 변화를 나타내지는 않았다. 탁도는 연평균 2.70 NTU이며, 봄과 여름 우기(wet days) 조사에서 탁도는 평균 3.58 NTU로 강우 이후 연구지점의 탁질이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 미생물 지표항목인 대장균과 장 구균 및 대장균 파지 SC와 MSC의 계절별 분포를 분산분석한 결과 계절에 따른 유의한 차이를 나타내지는 않았으나($p>0.05$), 건기와 우기 사이 수질 항목간 유의한 차이($p<0.05$)를 나타내어 강우는 연구대상 지역의 이화학적 및 미생물학적 변화에 매우 중요한 인자임을 확인하였다(Table 5).

계절에 따른 지표 생물 평균 농도 그래프를 통해서도 여름과 겨울 사이 대장균과 대장균 파지 SC가 유의한 차이가 있음($p<0.05$)을 알 수 있었고, 대장균과 대장균 파지 SC가 봄부터 여름까지 높았다가 가을부터 겨울에 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

채수지점에 따른 건·우기 지표 미생물의 분포 변화

S4와 S5를 제외한 대부분의 지점에서 강우 전에 비해 강우 후에 지표 미생물 농도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). S4(수영하수처리장 방류구)와 S5(동부하수처리장 방류구)에서는 지표 생물의 강우 전후의 농도 차이는 나타나지 않았다. 그 외 지점에서는 대장균과 대장균 파지 SC의 강우 전후 증가폭이 장 구균과 대장균 파지 MSC에 비해 비교적 크게 나타났고, S7(광안리해수욕장)에서의 증가폭도 커서 강우 시 수영강 수계를 통해 대장균과 대장균 파지 SC 유입량이 큰 폭으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

건기와 우기 시 연구 지점에 대해 공간분석법을 적용하여 작성한 오염 분포 그림(Fig. 4)을 보면, 건기에는 두 개의 하수처리장 방류구(S4, S5)에서 나온 지표 미생물의 영향으로 인근 오염도가 증가하였다가 수영강 하류로 갈수록 회복되는 것을 보여주었지만, 우기에는 온

Table 5. Seasonal characteristics in physiochemical factors and waterborne microbial indicators

Season	N	Temp. (°C)	pH	DO (mg/l)	Salinity (PSU)	Turbidity (NTU)	<i>E. coli</i> (MPN/ 100 ml)	Enterococcus (MPN/ 100 ml)	Coliphage (PFU/100 ml)	
									SC	MSC
Spring	31	16.5	7.2	8.0	11.63	3.17	2.0×10^3	4.2×10^3	1.2×10^3	4.0×10^1
(Dry days) ^a	(19)	16.9	7.2	7.8	11.68	2.40	5.8×10^3	1.0×10^3	4.8×10^2	1.0×10^1
(Wet days) ^b	(12)	15.8	7.3	8.4	11.56	4.40	4.2×10^4	9.3×10^3	2.3×10^3	7.5×10^1
Summer (Wet days) ^c	14	23.7	7.2	6.6	13.88	2.75	3.0×10^4	4.2×10^3	1.4×10^3	2.5×10^1
Autumn (Dry days)	21	18.1	7.3	7.6	14.12	2.30	8.2×10^3	3.3×10^3	2.1×10^3	9.0×10^0
Winter (Dry days)	15	9.5	7.4	10.9	14.07	2.07	2.8×10^3	2.1×10^3	1.2×10^2	9.0×10^0
Total	81	16.9	7.3	8.2	13.10	2.7	1.6×10^4	3.6×10^3	1.3×10^3	2.2×10^1

Temp, Temperature; DO, Dissolved oxygen; PSU, Practical salinity unit; NTU, Nephelometric turbidity unit; *E. coli*, *Escherichia coli*; SC, Somatic coliphage; MSC, Male-specific (F^+) coliphage; MPN, most probable number; PFU, plaque forming unit; N, number of samples; Spring months: March, April, and May; Summer months: June, July, and August; Autumn months: September, October, and November; Winter months: December, January, and February.

^a Days with no rain at least for 3 days

^b Spring wet days; after a day with 9.5 mm and 20.0 mm of rain

^c Summer wet days; after a day with 3.0 mm and 10.0 mm of rain

It showed no significant difference with season ($p > 0.05$) according to ANOVA analysis. t-test result indicated significant difference between Dry days and Wet days ($p < 0.05$).

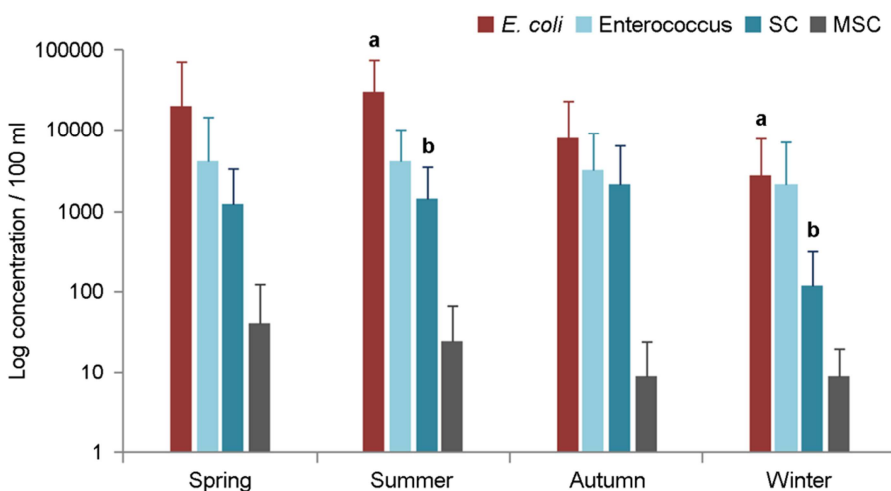


Figure 2. Seasonal variation in the distribution of microorganism indicators at all study sites. *E. coli*, *Escherichia coli*; SC, Somatic coliphage; MSC, Male-specific coliphage. Error bars indicate standard deviation and *E. coli* (a) and SC (b) are showed significant difference between summer and winter according to *t*-test ($p < 0.05$).

천천과 수영강 상류로부터 유입되는 각종 분변오염원의 영향을 받아 대장균과 장알균이 증가하고 수영만을 거쳐 광안리해수욕장 인근까지 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

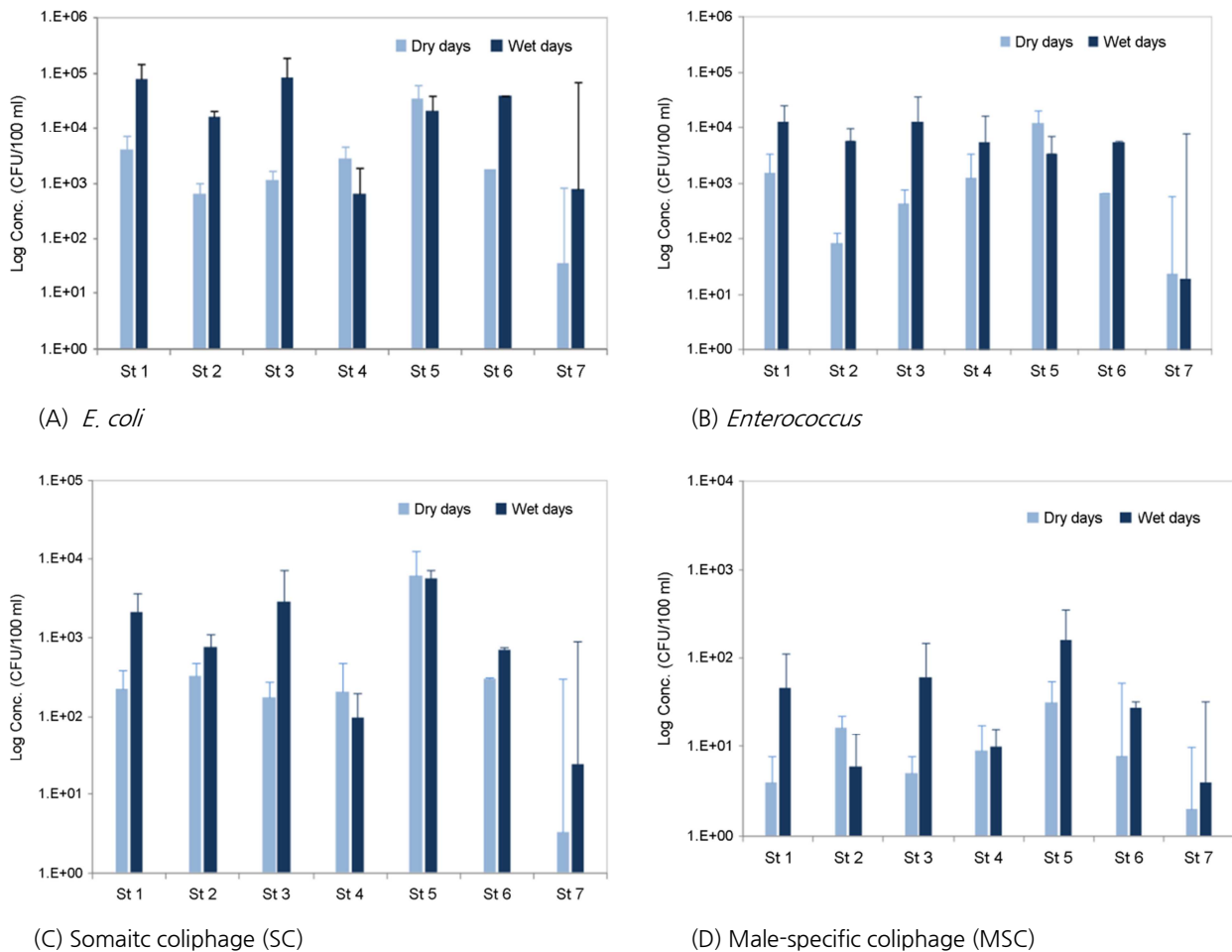


Figure 3. Comparison of fecal bacteria and coliphages in dry days and wet days by sample location. It showed significant difference between Dry days and Wet days according to *t*-test ($p < 0.05$).

DISCUSSION

부산지역 대표 도심 하천인 수영강 수계를 중심으로 2017년 1월에서 11월까지 7개 지점에서 13회(건기 9회, 우기 4회) 채취한 총 81건의 시료를 대상으로 소량의 시료를 이용한 무기농축법을 적용하여 노로바이러스 오염도를 분석하고 장염 지표 미생물의 오염도 특성을 조사하였다.

조석에 따라 염분이 변화하는 기수역 하천과 해수에서 노로바이러스를 검출하기 위해 소량의 시료를 이용한 양이온(Al^{3+}) 코팅 필터 무기농축 방법을 적용하여 시험한 결과, 노로바이러스를 접종한 자연 하천수 시료에 대해 $48.8 \pm 12.2\%$, 자연 해수 시료에 대해서는 $27.4 \pm 6.0\%$ 의 회수율을 나타내어 기존의 유기농축 방법 보다 높은 회수율을 확인하였다. Katayama 등 (16)이 2002년도에 해수에 대해 노로바이러스와 기타 장관계바이러스에 대한 회수율을 연구한 결과 인공 해수와 자연 해수에 폴리오바이러스(poliovirus)를 접종하여 HA 필터에 Al^{3+} 양이온 코팅하여 여과 농축 후 NaOH를 이용하여 바이러스를 용출하는 방법을 처음으로 제시하였으며, 1 L의 인공 해수에 접종한 poliovirus의 평균 회수율을 62% ($n = 8$)로 보고하였으며 1 MDS 필터를 이용하여 beef extract를 이용한 유기농축 방법의 회수율이 6%이었던 것에 비해 상당히 높은 회수율을 나타내었다. 또한, 어류질병바이러스 세포배양액을 해수에 첨가하여 GF/C여과와 HA filter를 이용한 무기농축 회수율은 23.0~28.1% (21), Feline calicivirus 배양액을 해수에 접종 여과(GF/C+HA filter)하였을 때 24.5~25.9% (22)를 보고한 것을 토대로, 양이온 코팅 무기농축 방법이 비교적 소량의 해수에 대해 높은 회수율을 나타내는 것을 확인할 수

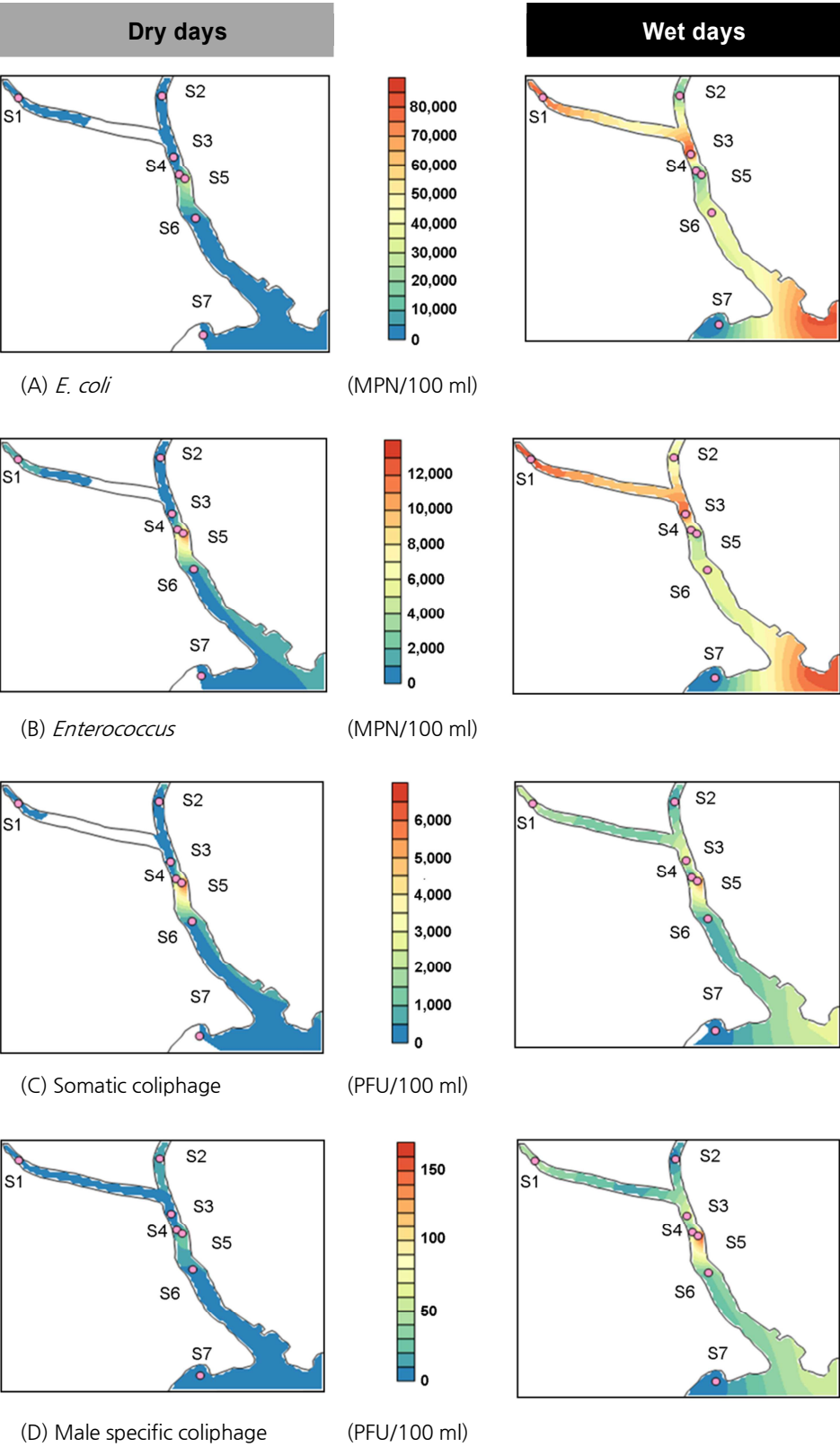


Figure 4. Variability of microorganism indicator in dry days and wet days at study area. The color shows the changes of concentration level of the indicator microorganism. Concentration units are shown above each color bars.

있었고 본 시험에서도 자연 해수와 하천수를 이용하여 회수율을 테스트하여 동등 이상의 결과를 확인하였다.

노로바이러스 감염 환자의 분변에는 장내에서 대량으로 증식한 바이러스가 배출되지만, 물에 유입된 노로바이러스는 재증식하지 않으며 다량의 물에 희석되면 검출 여부 확인과 정량적 분석은 일종의 확률적 사안이다. 더욱이 수영장과 같이 수심이 깊고 넓은 하천의 경우 100 ℓ 이상 대량의 시료를 채취하기 위한 장소를 찾기 어려우며 하천 주변 여건 상 채취자의 안전 또한 위협받을 수 있으므로 소량의 시료를 이용한 효율적인 농축방식의 검토가 필요하다. 따라서, 이 연구는 지하수에 비해 탁도가 훨씬 높고, 염분이 높은 하천을 대상으로 2 ℓ의 소량의 시료로 무기농축방식을 적용하여 노로바이러스를 정량적으로 검출한 의미 있는 결과이다. 다만, 수확한 바이러스의 양이 적어 유전자 아형 분석까지 확인하는데 어려움이 있었지만, Real-time PCR을 통해 존재하는 소량의 노로바이러스를 비교적 쉽게 분석할 수 있는 적절한 방법이었다고 판단된다.

수계 중에서 검출된 노로바이러스는 설사 환자 유행시기와 같은 2, 5, 11월에 4건의 노로바이러스 GI를 정량적($5.7 \times 10^3 \sim 6.8 \times 10^6$ copies/100 ml)으로 검출하였으며, 기타 장염 지표 미생물들도 함께 고농도로 검출되는 것을 확인하였다. 노로바이러스는 2개의 하수처리장 방류구와 인근 500미터 하류에서 확인되었으며 수영장 하류에서 이어지는 해수욕장에서는 불검출로 나타났다. 동유럽 그루지아 조개잡이 지역 하구역에서 2 ℓ 소량의 시료를 이용한 기수역 하천수 8.3% (6/72)에서 노로바이러스 GI과 GII가 검출되었고 (13), Ueki 등 (11)은 일본의 조개류와 주변 강물에서 노로바이러스를 검출하였으며, 하수 및 처리된 하수로 인해 노로바이러스 오염이 많은 것으로 결론을 내렸다. 노로바이러스는 주로 환자의 분변을 매개로 하여 전파되며 노로바이러스 설사 환자가 많은 겨울과 봄에 하수처리장 방류수에 노로바이러스의 존재 가능성은 충분하며 여러 문헌을 통해 이미 많은 보고 (8~11)가 있었다. 또한, 2012년부터 2015년까지 부산에서 발생한 설사 환자 분변 중 13.7% (71/581)에서 노로바이러스를 검출하였으며, 11월 (25.4%)에서 2월 (28.2%) 사이에 노로바이러스 검출율이 가장 높고 유전자군은 주로 GII가 대부분을 차지하였다 (23). 부산지역에서 발생한 노로바이러스 설사 원인 대부분이 노로바이러스 GI임을 감안하면 하수처리장 최종 방류수 또는 하천에서도 동일한 노로바이러스 GII가 검출됨으로써 유행하는 노로바이러스의 이동 흔적을 확인할 수 있었다. 그러나, 현재 노로바이러스 검사 방법은 바이러스의 감염력을 확인하는 세포배양법이 아직 개발되어 있지 않아 유전자 분석을 통해서만 바이러스의 존재를 확인할 수 있으므로 검출된 결과가 사람에 대한 감염력을 가지는지 여부는 증명할 수 없으며, 현재 또는 과거에 존재한 바이러스 유전자로 오염의 가능성과 그 이동경로를 판단해 볼 수 있다.

지표 미생물의 분포 특성을 조사한 결과, 강우는 연구대상 지역의 이화학적 및 미생물학적 변화에 매우 중요한 인자임을 알 수 있었고 장알균과 대장균 파지 MSC는 계절적 변화 특성보다는 강우에 의한 오염원 유입에 의해서 농도 차이를 내는 것을 확인하였다. 장알균은 온혈동물의 장내에서만 주로 서식하며 미처리된 하수 100 ml 중 $4.7 \times 10^3 \sim 4.0 \times 10^5$ MPN 존재한다고 알려져 있어, 강우 시 유출수 및 미처리 하수 등을 통한 유입 우려가 크다고 할 수 있다. SC와 MSC와 같은 대장균 파지는 장관계바이러스와 같이 온혈동물의 장에 서식하는 장내세균인 대장균을 숙주로 감염하여 그 안에 증식하는 세균성 바이러스로 서식환경이나 배출 원인이 장관계바이러스가 갖는 기본적인 성질과 특징이 유사하다. 즉, 대장균이 많은 환경에서 조건이 맞으면 충분히 증식할 수 있고 수처리나 소독처리 과정과 같은 조건에서도 저항성이 장내바이러스보다 커서 바이러스 연구에 있어 가치 있는 수단이 되는 것이 보고되었다 (24). 특히, MSC는 성섬모 (sex-pili)를 수용체로 이용하는데 SC의 크기가 80~400 nm인 것에 비해 20~30 nm로 크기도 작고 숙주 특이성이 높아 환경 중에서 재증식하지 않기 때문에 상대적으로 낮은 농도로 분포하지만 가장 장관계바이러스의 지표로 적합한 것으로 알려져 있다 (25~27). 이번 연구 결과를 통해 대장균 파지 중 SC는 대장균과 분포 특성이 유사해 장염을 지표하는 바이러스로서의 특이도가 낮았으며, MSC가 노로바이러스 검출범위와 유사한 분포 특성을 나타내어 장관계바이러스를 지표하는 특이성이 높음을 확인하였다. 특히, 강우 이후 MSC의 증가는 노로바이러스의 오염도를 증가시킬 수 있음을 보여주었다.

채수지점에 따른 건기와 우기 지표 미생물 분포 특성을 분석한 결과 수영장 수계는 건기에는 하수처리장 방류수의 영향으로 인근 미생물 오염도가 증가하지만 수영장 하류까지 영향이 미치지 않았고, 강우 시에는 비점오염원의 영향력이 가세하여 수영장 하류까지 전반적인 분변지표 세균 오염도가 증가하였다. 하절기 3.0~20.0 mm 범위의 강우는 해수욕장의 미생물학적 오염도 증가에 충분한 영향을 줄 수 있음을 확인하였으며 이는 저자의 이전 연구에서 2.5~3 mm 이하의 강우에서는 해수욕장 미생물 오염도 변화에 큰 영향이 없지만 그 이상의 강우는 오염도를 증가시켜 해수욕장 장 구균, 대장균 오염도 수준을 높인다는 결과 (28)를 뒷받침하였다. 한편, 대장균 파지는 건기에 비해 우기 오염도가 증가하지만 하류로 갈수록 오염도가 감소하는 것으로 볼 때 노로바이러스와 같은 장관계바이러스는 농도가 낮아 하류로 갈수록 희석되어 수영장 하류까지 확산하지 않는 것으로 판단하였다.

이번 연구는 소량의 시료로 탁도가 높고 염분의 변화가 심한 하천을 대상으로 무기농축방식을 적용하여 노로바이러스를 정량적으로 검출한 의의가 있으며, 부산 도심 하천을 중심으로 수 환경 중 노로바이러스 이동을 이해하고 레저 및 해수욕 이용 시 장염 예방에 대한 참고할 만한 결과를 제시했다고 판단된다. 아울러, 비점오염원 저감을 통한 강우 시 분변 오염원 부하량을 줄여 건강한 하천을 유지하는

정책이 뒷받침되어야 할 것이다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구는 환경부 국립환경과학원 환경분야 시험검사의 국제적합성 예산 연구지원(076-1900-1946-309330)에 의해 수행되었다.

REFERENCES

- 1) Belliot G, Noel JS, Li JF, Seto Y, Humphrey CD, Ando T, *et al.* Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system of three new genetically distinct strains of Norwalk-like viruses. J Clin Microbiol 2001;39:4288-95.
- 2) Green J, Wright PA, Gallimore CI, Mitchell O, Morgan Capner P, Brown DW. The role of environmental contamination with small round structured viruses in a hospital outbreak investigated by reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay. J Hosp Infect 1998;39:39-45.
- 3) Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology 2006;346:312-23.
- 4) Jung JH, Yoo CH, Koo ES, Kim HM, Na Y, Jheong WH, *et al.* Occurrence of norovirus and other enteric viruses in untreated groundwaters of Korea. J Water Health 2011;9:544-55.
- 5) La Rosa G, Fontana S, Di Grazia A, Iaconelli M, Pourshaban M, Muscillo M. Molecular identification and genetic analysis of Norovirus genogroups I and II in water environments: comparative analysis of different reverse transcription-PCR assays. Appl Environ Microbiol 2007;73:4152-61.
- 6) Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennerma H, Duizer E, van Duynhoven Y, *et al.* Analysis of integrated virological and epidemiological reporter of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. J Clin Microbiol 2008;46:2959-65.
- 7) Yang N, Qi H, Wong MM, Wu RS, Kong RY. Prevalence and diversity of norovirus genogroups I and II in Hong Kong marine waters and detection by real-time PCR. Mar Pollt Bull 2012;64:164-8.
- 8) Katayama H, Haramoto E, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, *et al.* One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. Water Res 2008;42:1441-8.
- 9) Rodriguez-Diaz J, Querales L, Caraballo L, Vizzi E, Liprandi F, Takiff H, *et al.* Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. Appl Environ Microbiol 2009;75:387-94.
- 10) Aw TG, Gin KY. Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. J Appl Microbiol 2010;109:716-30.
- 11) Ueki Y, Sano D, Watanabe T, Akiyama K, Omura T. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oyster. Water Res 2005;39:4271-80.
- 12) Lee C, Kim SJ. The genetic diversity of human noroviruses detected in river water in Korea. Water Res 2008;42:4477-84.

- 13) Gentry J, Vinjé J, Guadagnoli D, Lipp EK. Norovirus distribution within an estuarine environment. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:5474-80.
- 14) Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H, Ohgaki S. Detection of genogroup IV in wastewater and river water in Japan. *Lett Appl Microbiol* 2009;49:655-8.
- 15) Mans J, Netshikweta R, Magwalivha M, Van Zyl WB, Taylor MB. Diverse norovirus genotypes identified in sewage-polluted river water in South Africa. *Epidemiol Infect* 2013;141:303-13.
- 16) Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1033-9.
- 17) Tong HI, Connell C, Boehm AB, Lu Y. Effective detection of human noroviruses in Hawaiian waters using enhanced RT-PCR methods. *Water Res* 2011;45:5837-48.
- 18) Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, *et al.* Surveillance of adenovirus and noroviruses in European recreational waters. *Water Res* 2011;45:1025-38.
- 19) Gibbons CD, Rodriguez RA, Tallon L, Sobsey MD. Evaluation of positively charged alumina nanofibre cartridge filters for the primary concentration of norovirus, adenoviruses and male-specific coliphages from seawater. *J Appl Microbiol* 2010;109:635-41.
- 20) Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP, Pepper IL. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:1318-24.
- 21) Jee BY, Kim KI, Lee SJ, Kim KH, Jin JW, Jeong HD. Detection of fish pathogenic viruses in seawater using negatively charged membranes. *Korean J Fish Aquat Sci* 2013;46:46-52.
- 22) Lee HJ, Oh EG, Yu HS, Shin SB, Son MJ, Jung JY, *et al.* Recovery of Norovirus surrogate in seawater using an electropositive and electronegative filter. *Korean J Fish Aquat Sci* 2009;42:238-42.
- 23) Koo HS, Ku PT, Lee MO, Baik HS. Prevalence of Noroviruses Detected from Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Busan, Korea. *J Life Sci* 2016;26:911-20.
- 24) Jheong WH, Kim JM, Jang SJ, Park JY, Oh JH, Choi HJ, *et al.* A study on the bacteriophages as indicators of viruses in water environment. National Institute of Environmental Research Report 2008-52-1002.
- 25) Grabow WOK. Microbiology of drinking water treatment; reclaimed wastewater. In:McFeters GA(ed.) *Drinking Water Microbiology-Progress and Recent Developments*. New York: Springer Verlag; 1990. p.185-203.
- 26) Havelaar AH, Van Olphen M, Drost YC. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:2956-62.
- 27) AWPRC study group on health related water microbiology. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res* 1991;25:529-45.
- 28) Choi SH, Lee SM, Kim GS, Kim MH, Ji HS, Jeong YN, *et al.* Effects of Rainfall on Microbial Water Quality on Haeundae and Gwangang Swimming Beach. *J Bacteriol Virol* 2016;46:71-83.