

漢江에서 分離한 二種 Coliphage의 同定과 粘土質에 대한 吸着 및 溶出效果

洪淳佑 · 河永七 · 安泰爽 · 李英淑

(서울대학교 自然科學大學 微生物學科)

Identification of two coliphages from Han-river and its
adsorption-elution effect on soil materials

HONG, Soon-Woo, Yung Chil HAH, Tae Seok AHN, and Young Sook LEE

(Dept. of Microbiology, Seoul National Univ.)

ABSTRACT

Coliphages isolated from Han-River from September 1980 to August 1981 were classified by morphological and physiological characteristics. Effects of soil material on the fate of coliphage in nature were investigated.

1. The correlation coefficient between coliphage and *E. coli* which was host of coliphages in nature was 0.7173 ($p=0.004$).
2. Coliphage I isolated from Han-River of which DNA molecular weight was 27×10^6 daltons was identified as T_1 phage and coliphage II of which DNA molecular weight 72×10^6 daltons was classified as T_5 phage.
3. Soil material SW was composed of 63.65% silt and 21.92% clay. Clay was consisted of illite, kaolinite and chlorite evenly. Soil material J was composed of 68.92% silt and 11.67% clay. Clay consisted of smectite only.
4. Coliphage was adsorbed to soil material J more than soil material SW, and T_1 coliphage was adsorbed to soil material more than T_5 coliphage was.
5. The phage adsorption efficiency to soil material was enhanced at lower pH: The phage adsorption efficiency at pH 4 was 27 time higher than at pH 7.
6. Divalent (Ca^{2+}) and trivalent (Al^{3+}) enhanced the phage adsorption efficiency to soil material from 4 to 39 and from 17 to 91 times higher than monovalent ion (Na^+), respectively.
7. The concentration of organic compound was inversely related to the phage adsorption efficiency to soil.
8. Adsorption of phage onto soil material, and elution efficiency of elutants was in the order of D.D.W) > tap water > river water > seawater.
9. The higher the concentration of organic compound was, the more were adsorbed phages to soil eluted.
10. Coliphages survived longer in sterile soil suspension than in nonsterile soil material suspension.

緒 論

最近 急進的인 人口增加와 都市化로 말미암아 莫大한 量의 都市下水가 隣近河川이나 沿岸海水로 배출되고 있으며, 이 배출액에는 상당수의 病原性 virus가 存在한다(Bitton, 1975). 따라서 水界나 土壤에서의 virus의 動態는 保健衛生 및 生態學的 측면에서 매우 重要한 관심을 불러일으키고 있다(Scarpino 1978). 특히 自然水界內에서의 virus의 動態에 대해서는 Hurst (1980), Labelle(1980), Gerba(1975), Moore(1975)등은 站土 입자와 virus가 서로 吸着되어 沈澱됨으로써 水界內의 virus의 개체수가 減少될 수 있다고 주장했다. 그러나 Carlson(1968), Landa(1979) 및 Sobsey(1980)等은 이들 virus와 站土와의 관계가 可逆的이므로 점토로부터 水界로 virus가 溶出되어 다시 그 活性을 찾을 수 있다고 보고했다.

站土와 virus의 吸着기작에 대하여 Bitton (1974)은 다음과 같이 설명했다. 즉, virus나 站土같은 吸着劑들이 물속에서 자유롭게 brown운동을 하다가 서로 우연히 衝突한 뒤, 배지 내의 이온강도가 높으면 이들 사이의 이중막의 두께가 減少되면서 Van der Waals힘이나 정전기력에 의해 서로 吸着된다. 또한 Cookson(1967)은 吸着하는데 있어 tail fiber의 역할이 중요하다고 示唆하기도 했다.

일단 站土에 부착된 virus는 그 活性이 阻害를 받기 때문에 점토와 같은 성질을 지닌 吸着劑를 이용하여 virus를 제거할 수 있는 方法에 대해 Fass (1980)等이 많이 연구를 하였다. Cliver(1968), Goyal(1980)等은 이러한 성질을 이용하여 水界에 微量 存在하는 virus를 濃縮시켜 virus에 관한 연구에 이용하고 있다.

virus와 粘土의 吸着효과는 virus의 종류, 점토의 종류 및 여러가지 환경요인에 의해 크게 영향을 받으므로 粘土質에 의한 virus의 吸着, 除去는 지역별로 차이가 크다. 현재까지 環內에서 自然水內에서의 virus의 動態에 관한 보고는 거의 없었으므로, 本實驗은 서울시민의 급수원이 되고 있는 漢江을 대상으로 하여 실험상 用易한 coliphage의 動態를 연구하였다. 漢江에 存

在하는 2종류의 coliphage를 純粹分離하여 形態學的 生理學의 特徵에 의해 分類하였다. 또한 bacteriophage와 粘土사이의 吸着·溶出효과는 경상남도 하동에서 採取한 고령토 및 일본 Junsei 시약회사에서 판매되는 活性白土를 사용하여 하러가지 환경조건 밑에서 관찰하였다.

材料 및 方法

試料의 採取 및 phage의 分離

서울시내를 흐르는 漢江本流에서 천호대교, 제 3 한강교, 인도교, 성산대교를 각각 定點 1, 2, 3, 4로 하여 1980年 9월부터 1981年 8월까지 每月 1회씩 총 12회를 每隔된 DO병으로 채수하여 냉장처리한후 즉시 실험실로 운반시료로 제공되었다.

試料 35ml를 0.45 μ m여과지로 여과하여 細菌을 제거한 다음 초원심분리기(Hitachi, 65p-7)로 25,000rpm에서 1시간 동안 초원심분리를 한 후 그 침전물을 nutrient broth로 2ml의 현탁액으로 만들었다.

phage計數는 代數期에 있는 *E. coli* K12를 宿主로 하여 nutrient agar培地上에서 重層法으로 16시간에서 20시간 동안 37°C로 배양한 다음 용균반의 숫자를 관찰하였다.

phage의 純粹分離는 크기와 모양, 濁度 정도가 다른 하나의 용균반을 분리하여 다시 宿主에 감염시키는 방법을 5회 반복함으로써 이루어졌다(Herriott 1952, Williams 1953).

phage溶菌液의 濃縮

용균반이 많이 나타난 上層培地를 0.1M sodium carbonate buffer (pH7.2)로 현탁시킨 다음 혼합기로 잘 섞고 Hitachi, 20PR-5 원심분리기를 사용하여 4°C에서 10,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 취해 0.45 μ m여과지로 여과했다.

이때 얻은 phage현탁액의 역가는 2.0×10^{10} plaque forming unit (PFU)/ml였다.

電子顯微鏡에 의한 觀察

collodion支持膜을 입힌 microscopic grid (300 mesh)에 농축된 phage試料를 2% phosphotungstate (pH7.2)로 negative staining한 다음 (Twarog, 1968), Hitachi, H-500 電子顯微鏡

으로 관찰했다.

一段 増植 實驗

代數期的 *E. coli* K12배양액 5ml와 phage試料 0.5ml를 혼합하여 M.O.I. 약 1로하여 5분간 37°C에서 항온시킨 후 Hitachi, 20PR-5 원심분리기로 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 nutrient 액체배지에 현탁하였다. 이를 1/100로 희석하여 37°C에서 배양하면서 Clowes와 Hayes (1968)의 방법을 일부 수정하여 chloroform으로 숙주세포를 분해하여 經時的으로 세포내 phage의 數와 세포밖 phage數를 측정함으로써 潛伏期와 放出數를 구하였다.

phage의 DNA分子量 結定

phage의 DNA分子量 結定은 DNase I과 RNase A(sigma)를 처리한 다음, Winkert *et. al.* (1976)의 방법을 약간 변형시켜 熱 phenol 抽出法을 실시했다. 얻어진 DNA를 DNA저장 완충용액에서 3시간 동안 透析한후 -20°C의 95% Ethyl alcohol로 침전시켰다. 이를 1.0% agarose gel로 전기영동을 실시했으며 對照 DNA로서는 열처리한 λ DNA와 ECO RI제한 효소로 처리한 λ DNA 및 *Lactobacillus casei*의 bacteriophage 중 CP I의 DNA (Kim, 1981)를 사용했다.

熱耐性

천호대교에서 採取한 淡水를 15일간 방치한 다음 0.45 μ m 여과지로 여과해서 얻은 여과된 淡水에 Adams와 Lark(1950)가 기술한 바와 같이 10⁻³M의 CaCl₂를 가한 후 phage試料를 0.1ml 접종했다. 이를 55°C 水槽에서 經時的으로 5分 10分, 20分, 30分, 60分 간격으로 生存 phage數를 측정하였다.

또 여과된 淡水 10ml에 濃縮된 T₁ phage試料를 0.1ml 가하고 각각 20°C, 25°C, 30°C에서 배양하면서 經時的으로 生存 phage數를 측정하였다.

pH安定性

0.1M phosphate buffer의 0.1M sodium bicarbonate buffer로 pH3.0, pH5.5, pH7.0, pH9.1, pH11.0의 용액을 만들고 phage試料를 0.1ml 접종한 다음 37°C에서 10분간 처리한 후 生存 phage數를 측정하였다.

0.1M phosphate buffer에 pH6, pH7, pH8,

pH 9, pH 10의 각 용액 10ml에 濃縮된 T₁ phage試料를 0.1ml가하고 15°C에서 배양하면서 經時的으로 生存 phage數를 측정하여 T₁ phage의 생존에 미치는 pH의 영향을 조사하였다.

coliphage I의 生存에 미치는 hypochloric acid의 영향

hypochloric acid가 coliphage I의 生存에 미치는 영향은 Shatter(1980)의 방법을 變形하여 4 ppm, 8ppm, 10ppm, 14ppm 및 20ppm의 hypochloric acid 용액 각 10ml에 濃縮된 phage試料를 0.1ml 가하여 상온에서 10분이 지난 후 生存 개체數를 측정하였다.

粘土質 分析

國內 하동에서 산출되는 고령토 SW(Special white, Lim *et. al.*, 1980)와 일본 Junsei시약회사에서 판매되는 活性白土(5C 1167)를 試料로 하여 이들의 입자를 크기에 따라 分別하였다. 含有광물의 定性分析은 日本 Rigaku 2037을 使用하여 Cuka radiation으로, scanning speed는 20의 범위 6°~30°로 하여 계측된 회절도를 Biscay(1965)의 방법에 따라 해석하였다.

粘土 濃度에 따른 吸着率

여과된 淡水에 각 粘土試料를 0%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2% 및 5%(w/v)가 되게끔 넣어 현탁하고 121°C, 15Lb로 15분간 습윤 멸균했다. 각 현탁액 20ml에 phage試料를 0.1ml 가하고 10분간 잘 혼합한 뒤 Sovall, SS-3원심분리기를 사용하여 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액에 남아 있는 phage數를 측정하였다. 따라서 점토입자에 吸着된 phage數는 대조구(粘土質 0%)와 각 현탁액의 상등액에서 측정된 phage數와의 차이로서 계산되었다.

pH가 phage의 吸着에 미치는 영향

pH가 phage의 吸着에 미치는 영향은 Sobsey (1980)의 方法을 따라 여과된 淡水에 0.1N HCl과 0.1N NaOH를 첨가하여 pH4, pH5, pH6, pH7의 각 용액 20ml에 粘土: SW와 J를 1%씩 넣은 다음 습윤멸균하고 phage試料를 0.1ml씩 가해서 위와 같은 방법으로 實點했다. 이 때 pH 자체의 영향에 의한 phage의 不活性化를 고려하여 각 pH 용액마다 粘土를 넣지 않은 대조구를 마련했다.

여러가지 ion이 phage의 吸着에 미치는 영향

Carlson *et. al.*(1968)의 방법을 일부 수정하여 여과된 淡水(pH7.0)에 NaCl, CaCl₂, Al₂(SO₄)₃, (NH₄)₂ SO₄·24H₂O를 각기 0.001M, 0.01M, 0.05M씩 가하고 粘土 J와 粘土 SW를 1%씩 넣은 다음 위의 같은 방법으로 實驗함으로써 여러가지 ion이 phage의 吸着에 미치는 영향을 조사하였다.

有機物이 phage의 吸着에 미치는 영향

有機物로서 beef extract('Lab-Lemco' powder, Oxoid, L29)를 사용하여 이를 여과된 淡水(pH 7.0)에 0.005%, 0.01%, 0.03% 및 0.05%씩 가하고 粘土 SW와 粘土 J를 각기 1%씩 넣은 다음 위의같은 방법으로 實驗했다. 상등액에 남아있는 phage數를 측정하여 phage의 吸着에 有機物이 미치는 영향을 조사하였다.

여러가지 水質에 의한 phage의 溶出효과

여과된 담수에 粘土 J를 1%씩 가한 다음 멸균했다. 각 현탁액 20ml에 phage 試料液을 0.1 ml씩 가하고 10분간 잘 섞은 다음 원심분리하여 상등액에 存在하는 phage數를 측정했다(①)

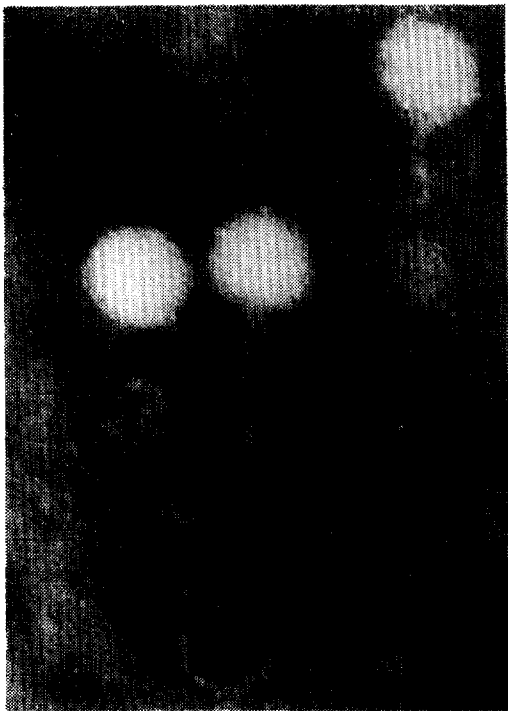
상등액을 따라버리고 멸균된 2차 증류수, 수돗물, 여과된 淡水 및 여과방치된 海水를 20ml씩 가한 다음 10분간 잘 섞고 원심분리하여 상등액에 存在하는 phage數를 측정했다(②). ①과 ②를 비교함으로써 溶出된 phage의 比率를 계산했다.

有機物の 濃도가 吸着된 phage의 溶出에 미치는 영향

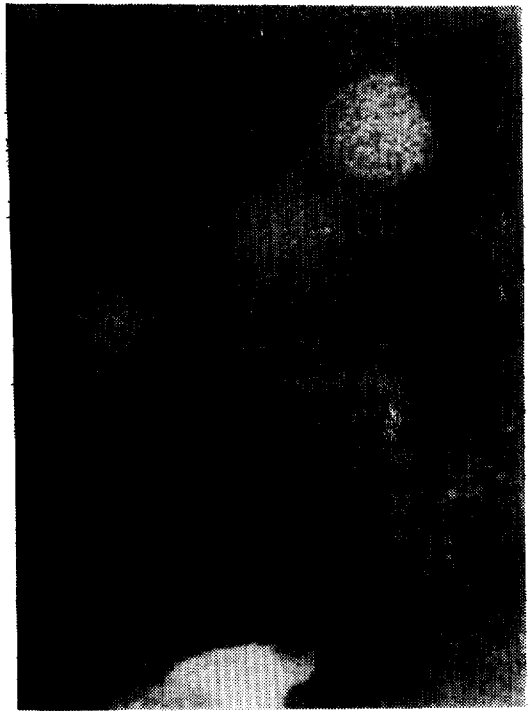
위의 같은 방법으로 實驗을 실시하되, beef extract의 濃도가 0%, 0.005%, 0.01%, 0.03% 및 0.05%인 멸균된 여과 淡水를 가해서 溶出 효과를 보았다. (Landry *et. al* 1978)

粘土 현탁액 내에서의 phage의 生存

粘土 현탁액 내에서의 phage의 生存에 미치는 生物學的 要因을 알아보기 위하여 멸균된 淡水와 멸균되지 않은 淡水를 이용하여 實驗을 실시했다. 여과된 淡水에 粘土 SW와 粘土 J를 1%씩 가하고 멸균한 현탁액과 오염된 淡水(定點 3에서 採取한 것)에 粘土를 넣고 멸균하지 않은 현탁액 10ml에 똑같이 phage 試料를 0.1ml씩 가



a



b

plate 1. Electron micrographs of coliphage I and II

- Electron micrographs of coliphage I stained with 2% phosphotungstate at pH7.2 ($\times 300,000$)
- Electron micrographs of coliphage II stained with 2% phosphotungstate at pH7.2 ($\times 400,000$)

하여 20°C에서 배양했다. 현탁액을 몇분간 걸쭉은 다음 0.1ml, 혹은 1ml씩 採取하여 經時的으로 phage數를 측정했다. (Berg, 1980)

結果 및 考察

1. coliphage의 分類 및 特性

1) 形態學的 特性

漢江本流 4個 定點에서 12개월에 걸쳐 *E. coli* K12를 宿主로 하여 나타난 용균반의 크기 및 形態, 濁度정도를 기준삼아 分離한 coliphage중 (Hong *et al.* 1982)출현빈도가 높은 2가지 종류 즉 coliphage I 과 coliphage II 를 순수분리하여 이를 電子顯微鏡으로 관찰하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

coliphage I 은 plate. 1에서 보듯이 head의 직경이 55nm정도이며, icosahedral의 形態를 이루었고, tail은 140nm정도로 가늘고 긴 구부러진 모습이였다. tail에 있어 收縮性을 보이지 않으므로 Bralley(1960, 1962, 1967)의 分類에 의해 B group에 속하는 것으로 사료된다.

coliphage II 는 head가 다면체의 形態로 직경이 65nm정도이며 coliphage I 에 비해 크다. tail의 길이는 120nm정도이며 그 직경은 12nm로 coliphage I 보다 약간 굵었으며, 역시 收縮性을 보이지 않으므로 Bradley(1960, 1962, 1967)의 分類에 의해 B group에 속하는 것으로 판단된다.

2) 生理學的 特性

coliphage는 종류마다 특이한 溶菌斑을 형성하므로 용균반의 형태는 phage분류에 중요하다 coliphage I 은 4~5mm에 이르는 크고 透明한 원형 용균반을 형성했으며 중심부는 바깥쪽에 비해 그 濃度가 짙었다.

coliphage II 도 역시 透明하고 원형인 용균반을 형성했으나 그의 크기는 0.5~1.0mm로 coliphage I 에 비해 훨씬 작았다.

一段 增殖實驗에 의해 얻어진 coliphage I 의 潛伏期는 13분, 放出數는 100으로 나타났으며, coliphage II 는 潛伏期가 33분, 放出數가 185로 나타났다.

3) coliphage DNA의 分子量

純粹分離한 coliphage I 과 coliphage II 의

DNA를 1% agarose gel로 전기영동하여 각각 2.7×10^7 daltons, 7.2×10^7 daltons의 크기임을 알게 되었다. (plate 2)

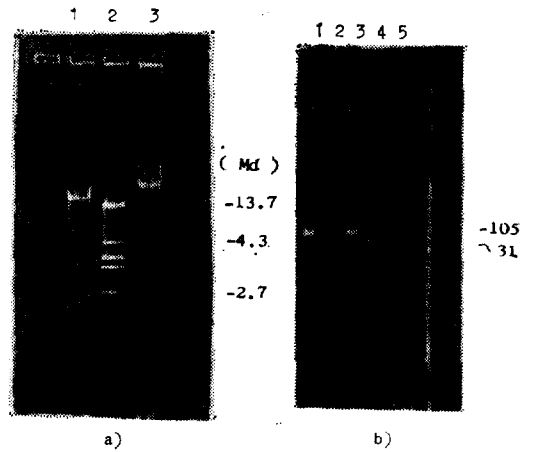


plate 2. agarose gel electrophoresis.

- a) Horizontal gel electrophoresis of coliphage I (lane 1), ECO R I treated λ DNA (lane 2) and coliphage II (lane 3). The gel was runned for 2 hrs. at 100V.
- b) Horizontal gel electrophoresis of coliphage I (lane 1), CP 1 DNA (lane 2), coliphage II (lane 3) and heated λ DNA (lane 4,5). The gel was runned for 4 hrs. at 70V.

Table 1. Characteristics of coliphages

phage strains		Coliphage I	Coliphage II
virion	head	icosahedral 55nm	icosahedral 65nm
	tail	8×140nm	12×120nm
morphology			
plaque size		4~5mm	0.5~1.0mm
<i>E. coli</i> B5		resistant	resistant
latent period		13min	33min
growth cycle at 37°C	avg. yield cell	100	185
	lysogeny	—	—
molecular wt. of viral DAN		27×10^5 daltons	72×10^5 datons

이상을 종합해 보면 Table 1에 나타났듯이 coliphage I 은 coliphage T₁으로, coliphage II 는 coliphage T₅로 추정해 볼 수 있다.

4) 物理, 化學的 要因에 대한 安定性

a. 熱耐性 : 0.001M CaCl₂가 添加된 여과 淡水에 coliphage를 현탁하여 55°C로 60分간 처리했을 경우 Fig. 1과 같이 coliphage T₅는 生存率이 50%이었으나 coliphage T₁은 99%이상 不活性化되어 뚜렷한 차이를 보였다.

coliphage T₁의 不活性化率(inactivation rate)은 biphasic으로 나타났다. 1次 不活性化率은 0.16min⁻¹이고 2次 不活性化率은 0.0034min⁻¹으로 계산되었다.

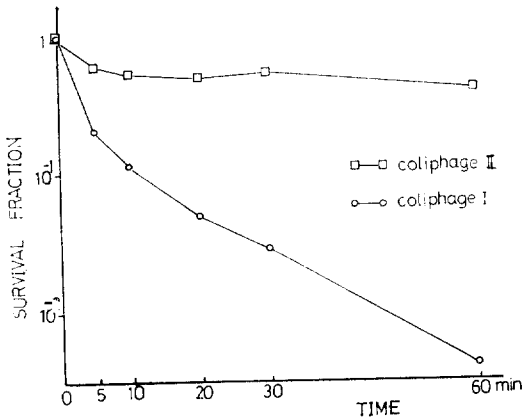


Fig. 1. Thermal stability of coliphage I (T₁) & coliphage II (T₅)
□—□ : coliphage II (T₅)
○—○ : coliphage I (T₁)

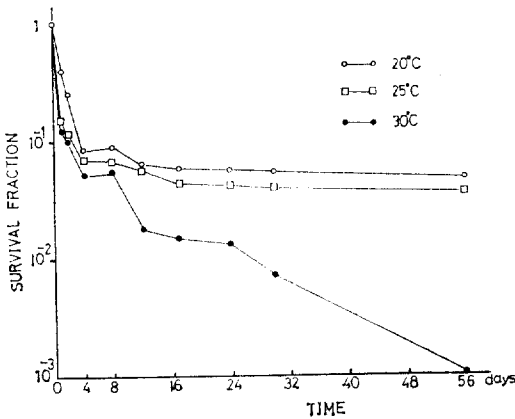


Fig. 2. Effects of temperature on survival of coliphage I (T₁)

coliphage T₁은 Fig. 2에서 보듯이 20°C, 25°C에서 초기 1주일만에 90%가 不活性化되며, 1주일 후부터 경시적 변화는 없었다. Agres(1977)은 coliphage MS 2가 20°C 海水에서 1주일이

경과되면 95%의 phage가 감소됨을 觀察했는데 이 結果로 볼 때 coliphage MS 2가 coliphage T₁보다 다소 不活性化率이 높음을 알 수 있다. 30°C로 처리하였을 때는 20°C, 25°C로 처리하였을 때보다 不活性化率이 월등이 높아 4日만에 95%의 감소율을 보였으며, 56日이 지난 후에는 99.93%가 감소하였다. 이처럼 T₁ coliphage는 溫度가 상승함에 따라 그 生存率이 낮아짐을 알았다.

b. pH안정성 : coliphage T₁과 coliphage T₅의 완충액내에서의 pH안정성을 본 coliphage T₅는 pH 5에서 pH 10에 이르기까지 비교적 광범위한 pH조건에서 安定하였고, pH 3에서 약 90%정도가 不活性化되었다. 그러나 coliphage T₁은 coliphage T₅에 비해 不安定하여 pH 5와 pH 10에서

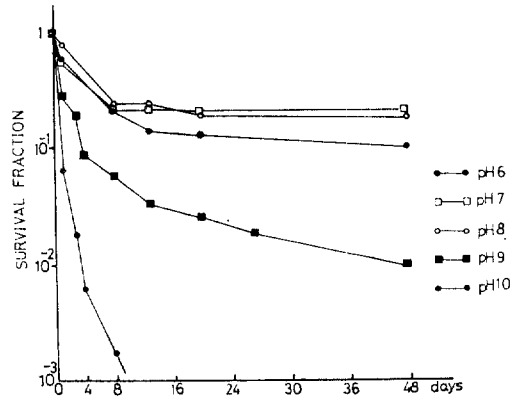


Fig. 3. Effects of pH on survival of coliphage I (T₁)

90% 이상 不活性化되었고 pH 3에서는 99% 이상이 不活性化 되었다.

위에서 본 바와 같이 온도와 pH에 있어 coliphage T₁이 coliphage T₅보다 감수성이 큰 것으로 나타났다. 따라서 coliphage T₁을 여러가지 pH조건하에 두고 經時的으로 그의 生存率을 조사하였다.

여러가지 pH용액 내에서의 coliphage T₁의 安定성은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 7 > pH 8 > pH 6 > pH 9 > pH 10의 순서로 점차 낮아지며 pH 6부터 pH 8까지는 상당히 安定한 모습을 나타내었다. 즉 pH 7과 pH 8의 완충액에서 coliphage T₁은 비슷한 減少率을 보여, 30%가 生存했고, pH 6에서는 같은 기간동안 90%정도가 不活性化되었다. 그러

나 pH 9에서는 4일만에 90%이상의 減少率을 보여 일반적으로 enteric virus가 自然水界内の pH 범위 (pH6~9)에서 安定하다는 Bitton(1975)의 보고와는 약간 차이가 있었다. pH 10의 경우는 하루만에 coliphage의 93%가 不活性化되었으며 1주일 후에는 99.8%가 不活性化되어 아주 不安定한 모습을 보였다.

c. coliphage T₁의 生存에 미치는 hypochloric acid의 영향: 下水처리에 있어 널리 쓰이는 殺菌方法중의 하나가 chlorination이다. Scarpino (1972)는 *E. coli*와 poliovirus I에 HOCl과 OCl⁻을 처리한 結果, poliovirus에 대해서는 OCl⁻이 *E. coli*에 대해서는 HOCl이 더 큰 殺菌효과를 나타낸다고 보고했다. Sharp *et. al.* (1980)은 pH가 높을수록 chlorine에 의한 不活性化정도가 커진다고 했다.

本實驗에서는 여러 濃度の hypochloric acid 용액내에서의 coliphage T₁의 生存率을 관찰한 結果 hypochloric acid의 濃도가 4ppm일 때 接種된 coliphage T₁은 10分후 10% 정도가 不活性化되었고, 9ppm부터는 그 정도가 갑자기 커져 phage의 98.5% 이상이 不活性化되었다. 또

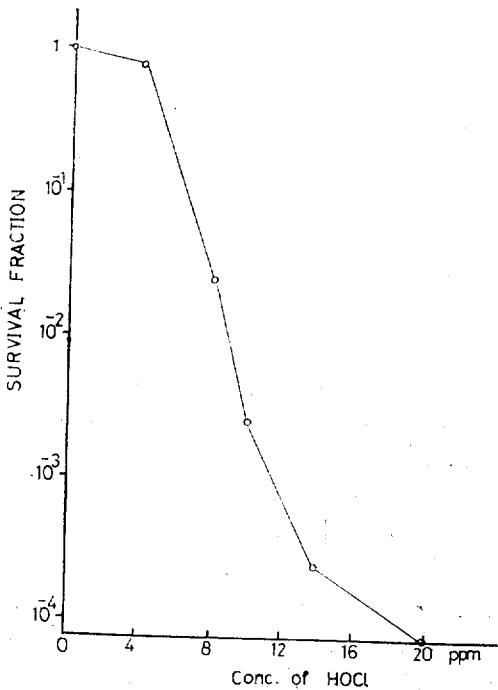


Fig. 4. Effects of hypochloric acid on survival of coliphage I (T₁)

한 coliphage T₁에 대한 hypochloric acid의 LD₅₀는 4.8ppm으로 나타났다. 10ppm일 때는 phage의 99.8%, 14ppm일 때는 99.98%가 不活性化되었으며 20ppm일 때는 99.995%가 不活性化되었다. hypochloric acid에 의한 coliphage T₁의 不活性化曲線은 Fig. 4에서 보듯이 세 단계로 나눌수 있으며, 1次 不活性化率은 0.025 ppm⁻¹, 2次 不活性化率은 0.009ppm⁻¹, 3次 不活性化率은 0.00025ppm⁻¹으로 나타났다.

2. coliphage와 粘土사이의 吸着 및 溶出관계

1) 粘土의 組織

粘土試料를 分析한 結果는 Table 2에서 보듯

Table 2. Analytical result of soil materials

soil type	silt(%)	clay(%)
SW	63.65	I, 36.69
		K, 37.99
		C, 25.32
		S, 0
J	68.92	I, 0
		K, 0
		C, 0
		S, 100

이 SW는 Illite, Kaolinite, Chlorite의 광물성분이 골고루 들어 있고, Smectite는 전혀 볼수 없는 반면, J는 粘土 대부분이 Smectite로 구성되어 있었다. 이처럼 含有광물의 성분이 서로 다른 粘土 SW와 粘土 J를 이용하여 coliphage의 吸着 및 溶出효과에 대해 조사해 보았다.

2) 粘土 濃도에 따른 phage의 吸着효과

Gerba(1975)는 coliphage T₂를 사용하여 自然海水와 人工海水에서 여러가지 다른 kaolinite의 濃도에 따른 virus의 吸着을 관찰했다. 그는 kaolinite 50mg/l일때 自然海水의 경우는 60%의 virus가, 人工海水의 경우는 90%의 virus가 吸着된다는 結論을 얻었다.

本實驗에서는 여과된 淡水에 일정한 比率로 粘土를 넣어주고 coliphage가 吸着되는 것을 관찰했다. 粘土 SW의 경우, Fig. 5에서 보듯이 coliphage T₁은 점토농도 0.25%(w/v)일때 이미 90%가량 吸着되었고, 0.5% 현탁액에서는 96%이상 吸着되었다. 粘土의 濃도를 증가시켜

주어도 별 變化가 없었다. coliphage T₅는 같은 粘土 SW에 대해 coliphage T₁보다 吸着하는 능력이 떨어져 0.25%현탁액에서는 45%, 0.5%현탁액에서는 53%, 1%현탁액에서는 78%가 吸着되었으며, 粘土濃도가 2%되었을 때 93%의 吸着率을 나타냈다. 그러나 粘土 J는 SW보다 coliphage를 吸着시키는 능력이 뛰어나서 0.25%현탁액에서 91%의 coliphage T₁을 吸着시켰고, coliphage T₅도 0.5%현탁액에서 92%이상 吸着시켰다.

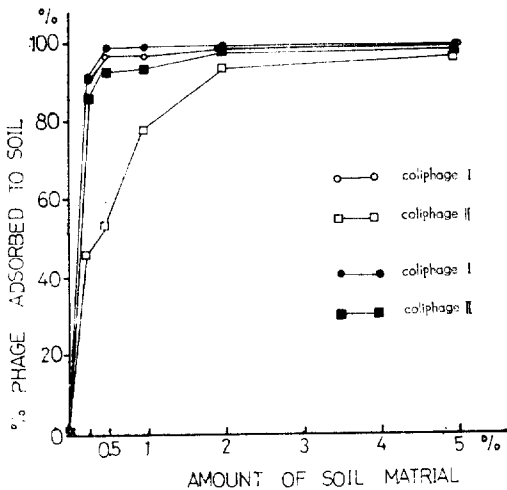


Table 5. Phage adsorption to soil material J and SW

이 結果에 의하여 이 후의 實驗은 모두 粘土濃度를 1%로 하여 실시했다.

3) pH가 coliphage의 吸着에 미치는 영향

Fildes(1969)에 의하면 水素 ion濃度は virus의 吸着에 영향을 주며 海水의 높은 pH는 virus가 粘土의 表面에 부착되는 능력을 변화시킬 수 있다고 한다.

本實驗에서는 pH 4, 5, 6, 7 1%인 粘土현탁용액에 일정량의 phage를 分散시켜 粘土에 吸着된 phage의 數를 計數하고, 이 數로부터 pH 자체에 의한 phage의 不活性化를 고려하기 위하여 粘土를 현탁시키지 아니한 각 pH 溶液에서 不活性化된 phage를 計數하여 除한 후 pH 7.0인 점토현탁액에서의 吸着 phage(0%)에 대한 백분율로 환산하였다(Fig. 6).

Fig. 6에서 보듯이 일반적으로 pH가 낮아질수록 phage가 粘土에 잘 吸着한다. 즉, pH 4일 때는 pH 7일때보다 2배부터 27배까지 효과가 좋

았다. 이 結果는 poliovirus와 reovirus를 이용하여 pH가 virus의 吸着효과에 미치는 영향에 대하여 관찰한 Sobsey(1980)의 보고와 일치했다

또한 coliphage T₁은 같은 粘土內에서 coliphage T₅보다 3%에서 13%까지의 높은 吸着力을 나타냈으며, 동일 종류의 phage에 대하여 粘土 J가 粘土 SW보다 40% 도 더 큰 吸着효과를 보였다.

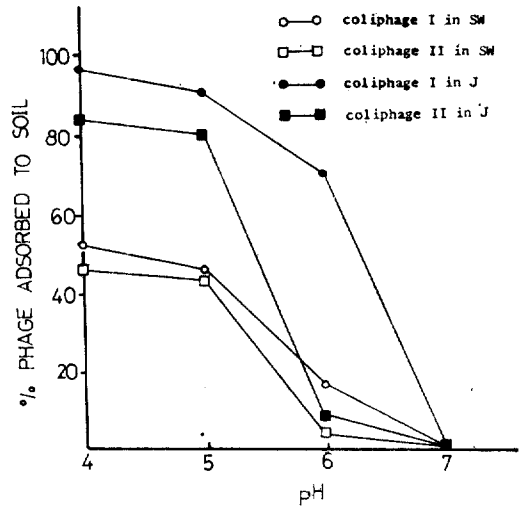


Fig. 6. Effects of pH on phage adsorption to soil materials

4) 여러가지 陽 ion이 phage의 吸着에 미치는 영향
여러가지 陽 ion이 coliphage T₁과 T₅의 吸着에 미치는 영향은 粘土만 넣어주고 ion을 첨가하지 않은 현탁액을 대조구로 하여, Na⁺, Ca²⁺, Al³⁺을 각각 0.001M, 0.01M, 0.5M씩 첨가시켜 줄 현탁액내에서 관찰했다. Table 3에서 보듯이 Na⁺와 Ca²⁺를 粘土 SW현탁액에 첨가시켜 주었을 때, Na⁺ 경우에는 0.05M의 농도에서 대조구에 비하여 99%의 phage가 吸着되었고, Ca²⁺의 경우는 0.01M농도에서 99%이상의 phage가 吸着되었다. Al³⁺를 첨가시켜 줄 경우에는 0.01M의 농도에서 coliphage의 98.2%정도가 吸着되었고, coliphage T₁은 0.001M에서 99.4%이상의 吸着되었다.

粘土 J 현탁액의 경우에는 粘土 J 自體가 virus에 대한 吸着力이 뛰어나므로 ion농도에 따른 吸着率차이가 粘土 SW 현탁액에 비해 작게 나타났다. Na⁺를 粘土 J 현탁액에 첨가시켜 주었을

Table 3. Effects of added ions on phage adsorption to soil materials

ion	soil materials phage strains	SW		J	
		coliphage T ₁	coliphage T ₅	coliphage T ₁	coliphage T ₅
	control	2.75×10 ⁷ (100%)	6.40×10 ⁷ (100%)	5.70×10 ⁴ (100%)	2.13×10 ⁵ (100%)
Na ⁺	0.001M	1.51×10 ⁶ (5.49%)	2.46×10 ⁷ (38.4%)	1.05×10 ⁴ (40.4%)	7.83×10 ⁴ (56.4%)
	0.01 M	4.16×10 ⁵ (1.51%)	2.18×10 ⁶ (3.40%)	1.05×10 ⁴ (18.4%)	7.83×10 ⁴ (36.7%)
	0.05 M	2.26×10 ⁵ (0.82%)	9.20×10 ⁵ (1.44%)	ND	7.33×10 ⁴ (34.4%)
Ca ²⁺	0.001M	1.59×10 ⁶ (5.78%)	6.60×10 ⁵ (1.03%)	5.35×10 ³ (9.39%)	3.00×10 ³ (4.70%)
	0.01 M	5.20×10 ⁴ (0.19%)	5.73×10 ⁵ (0.89%)	ND	1.00×10 ³ (1.41%)
	0.05 M	2.08×10 ⁴ (0.076%)	3.00×10 ⁵ (0.47%)	7.53×10 ² (1.32%)	1.88×10 ³ (0.88%)
Al ³⁺	0.001 M	1.69×10 ⁴ (0.06%)	1.47×10 ⁵ (2.30%)	ND	5
	0.01 M	ND	1.12×10 ⁶ (1.75%)	ND	ND
	0.05 M	ND	1.28×10 ⁵	ND	ND

ND : not detected

The numbers of phages indicate the number of the free suspended phages which are not absorbed on the soil materials.

때 0.01M 농도에서 대조구에 비해 coliphage T₁의 82%와 coliphage T₅의 63%정도가 흡착되었다. Ca²⁺의 경우에는 0.001M 농도에서 coliphage T₁의 91%가 coliphage T₅의 95%정도가 흡착되었으며, Al³⁺의 경우에는 흡착되지 않은 coliphage를 거의 검출할 수 없었다.

위에서 살펴본 것을 종합해 보면 Ca²⁺는 Na⁺에 비해 4배에서 39배가량, Al³⁺는 Na⁺에 비해 17배에서 91배이상 phage의 흡착효과를 높여준다는 것을 알 수 있다.

Carlson *et al*(1968)은 여러가지 양 ion이 존재할 때, bacteriophage T₂와 poliovirus가 kaolinite같은 점토에 쉽게 흡착된다는 것을 관찰했다. 그는 virus가 最大 흡착효과를 나타낼 때 1가 ion(Na⁺)은 2가 ion(Ca²⁺)보다 10배이상의 농도가 요구된다고 했는데, 그 결과에 본 실험 결과도 어느 정도 일치했다. 또한 Sobsey(1980)는 MgCl₂를 현탁액에 첨가시켜 주었을 때가 NaCl을 넣어 주었을 때보다 효과가 훨씬 크다

는 것을 관찰했다. 이상과 같이 1가 ion보다는 2가 ion이, 2가 ion보다는 3가 ion이 phage를粘土입자에 잘 흡착시키며, 이러한 성질을 이용하여 靜水과정에서 명반석같은 3가 ion을 사용하는 것은 아주 효과적이라 할 수 있다.

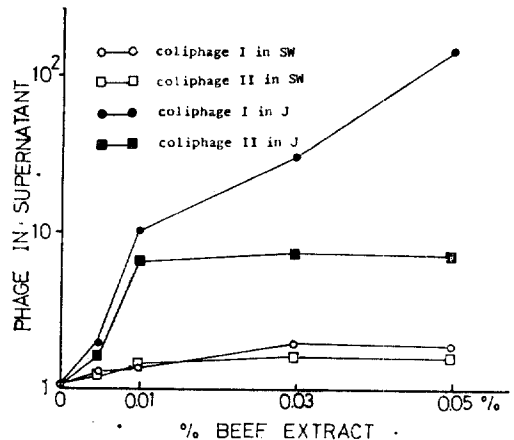


Fig. 7. Effects of organic substance on phage adsorption to soil materials.

5) 有機物の 濃도가 phage의 吸着에 미치는 영향
 有機物の 濃도에 따른 phage의 吸着효과는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 有機物の 濃도가 높아질수록 吸着率이 減少하는 것을 볼 수 있다. 粘土 SW 현탁액의 경우 beef extract의 농도가 0.05%일 때 대조구에 비해 1.58배에서 1.9배 정도의 phage가 吸着되지 않은 상태로 상등액에서 검출되었다. 粘土 J 현탁액의 경우 有機物 濃도가 0.01%일 때 대조구에 비해 7.5배 가량의 coliphage T₅가 상등액에서 검출되었고, coliphage T₁은 有機物 濃도 0.01%일 때 10배, 0.03%일 때 18.6배, 0.05%일 때 110배 이상이 상등액에 남아있었다. 이 결과는 有機物과 virus가 粘土입자에 吸着하는데 있어 경쟁적으로 작용한다는 Carlson *et al.*(1968)의 보고와 일치했다. 이는 自然水내에 有機物이 많으면 浮遊堆積物에 의한 virus除去가 阻害를 받는다는 것을 示唆한다.

6) 여러가지 水質에 의한 phage의 溶出효과

粘土입자에 대한 phage의 吸着은 可逆반응이므로 일단 粘土에 吸着되었던 phage라 하더라도 溶出이 가능하다.

本實驗에서는 ion含有量이 각기 다른 2차증류수, 수돗물, 여과된 淡水, aged seawater를 사용하여 이미 粘土에 吸着되었던 phage의 溶出효과에 대해 조사하였다. 그 결과는 Fig. 8에서 보는 바와 같이 粘土의 종류, 溶出液, phage의 종류에 따라 다르게 나타났다. 즉, 溶出液가운데 海水의 효능이 가장 낮게 나타나서, 2차 증류수가 溶出시키는 phage量의 $\frac{1}{3} \sim \frac{1}{10}$ 밖에 溶出시키지 못했다. 이것은 海水의 ion含有量이 가장 높기 때문이며, Na⁺ 농도가 높을수록 phage의 吸着이 좋다는 앞의 결과와도 일치했다. 또한 Sobsey(1980)도 poliovirus와 reovirus를 이용한 實驗에서 같은 결과를 얻었다.

粘土 및 phage의 종류에 따라 약간의 차이는 있으나, 평균적으로 볼 때 2차증류수 > 수돗물 > 淡水 > 海水의 순서로 그 溶出능력이 좋았다. coliphage T₅는 coliphage T₁에 비해 10배이상 溶出이 쉽게 일어났는데, 이것은 coliphage T₁이 coliphage T₅보다 점토입자에 대한 吸着능력이 좋기 때문인 것으로 해석된다. 粘土의 종류

에 따른 coliphage의 溶出효과를 보면, 粘土 SW 현탁액에서의 溶出이 粘土 J 현탁액에서보다 2배 정도 쉽게 일어났는데, 이것은 粘土 J가 粘

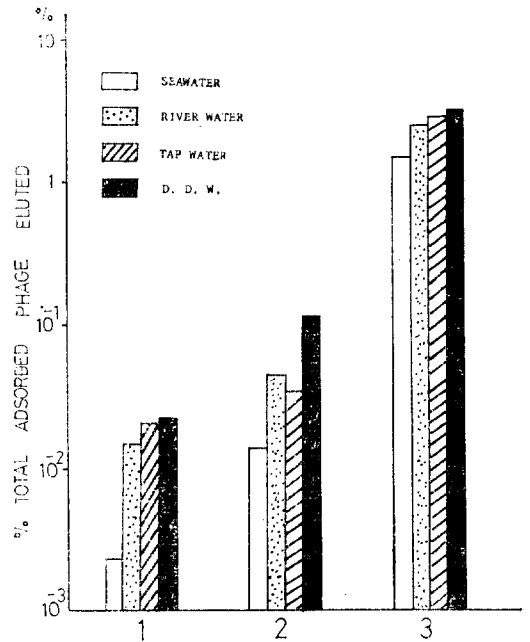


Fig. 8. Elution of adsorbed phage by various elutants 1, coliphage T₁ adsorbed to J; 2, coliphage T₁ adsorbed to SW; 3, coliphage T₅ adsorbed to SW

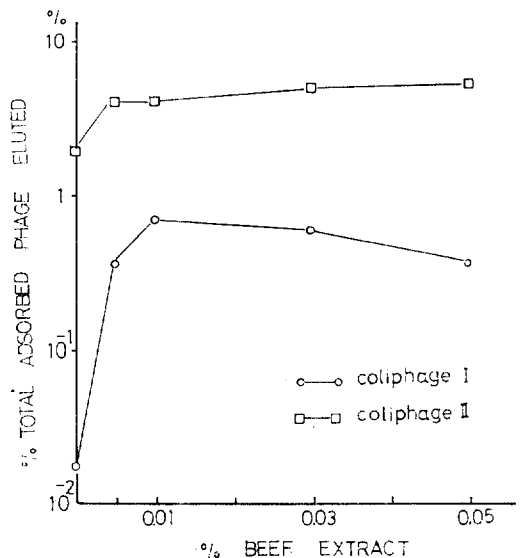


Fig. 9. Effects of organic substance on elution of phages adsorbed to soil materials.

土 SW보다 phage를 吸着시키는 능력이 좋다는 결과와 일치했다.

7) 有機物の 濃度에 따른 phage의 溶出효과

beef extract의 量이 많아질수록 粘土에 吸着되었던 phage가 溶出되는 量도 많아졌다. Fig.9에서 보듯이 粘土 SW에 吸着되었던 coliphage T₁의 경우, 0.01%(w/v)의 beef extract濃度에서 吸着된 virus의 0.67%정도가 溶出되어 나오는데, 이는 beef extract가 없을 때 溶出되어 나온 phage의 比率(0.017%)보다 약40배 가량 많은 것이었다. 같은 粘土에 吸着되었던 coliphage T₈의 경우는 beef extract의 濃度가 0.05%(w/v)일때 吸着된 phage의 5.12%가 溶出되었으며 이는 beef extract가 없을 때 溶出된 것(1.9%)보다 2.7배가량 더 溶出된 것이다.

이 결과는 beef extract가 粘土에 대한 phage의 吸着을 방해한다는 앞의 實驗結果와 일치하며, 有機物로 오염된 河川에서 phage와 같은 virus를 粘土를 이용하여 吸着·除去시키기에 있어 큰 문제점을 안겨주고 있다. 또한 일단 점토에 吸着된 virus라 할지라도 溶出이 용이하게 일어나므로 phage가 吸着된 粘土를 효과적으로 처리하는 방법이 중요시되고 있다.

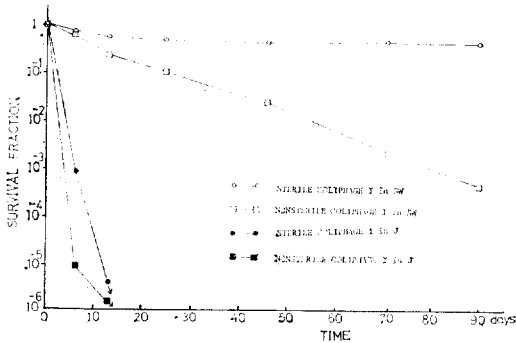


Fig. 10. Survival of coliphage I in sterile & nonsterile suspensions of soil materials.

8) 粘土 懸탁액에서의 phage의 生存

粘土 懸탁액 내에서 phage의 99%가 不活性化되는데 걸리는 시간은 다음 Table 4과 같다.

Table 4. Phage survival in sterile & nonsterile suspensions of soil materials(days).

soil type	coliphage I		coliphage II	
	sterile	nonsterile	sterile	nonsterile
SW	>90	68	>90	55
J	5	4	5	3

Fujioka(1980), Sobsey(1980)의 결과와 마찬가지로 멸균되지 않은 용액에서의 phage의 生存率은 멸균된 용액의 것보다 훨씬 떨어지는 것을 알 수 있다. 이것은 自然狀態의 淡水內에 있는 微生物에 의해 만들어지는 단백질분해효소같은 것들이 phage의 生存에 영향을 주기 때문인 것으로 사료된다. 또한 phage를 쉽게 吸着시키는 粘土일수록 그 懸탁액내에서 phage의 不活性化가 쉽게 일어나서 Fig. 10과 Fig. 11에서 보듯이 粘土 J의 경우 5일이 경과된 뒤 phage의 99% 이상이 減少되었다.

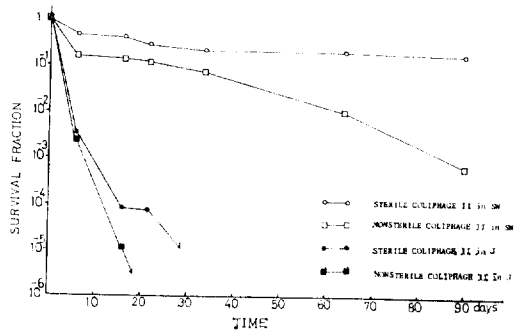


Fig. 11. Survival of coliphage II in sterile & nonsterile suspensions of soil materials.

摘 要

漢江에서 分離한 colihage를 形態學的·生理學的 特徵에 따라 分類하고, 自然界內의 phage 動態에 미치는 粘土質의 影響을 조사하여 다음과 같은 結果들을 얻었다.

1. coliphage의 地域別 개체수는 定點 2부터 急増하였으며 月 平均 變化는 그의 宿主가 되는 E. coli와 0.7173 (P=0.004)의 상관계수를 나타내었다.

2. 漢江本流에서 純粹分離한 coliphage I은 DNA 分子量이 27×10⁵ daltons 정도되는 T₁ phage로 coliphage

II는 DNA분자량이 72×10^6 daltons 정도되는 T₅ phage로 추정되었다.

3. 粘土 SW는 silt가 63.65%, clay가 21.92%이며 clay는 Illite, Kaolinite, Chlorite가 골고루 섞여 있었고, 粘土 J는 silt가 68.92%, clay가 11.76%로서 clay는 거의 100%가 Smectite였다.
4. 粘土 J가 粘土 SW보다 coliphage를 흡착시키는 능력이 뛰어나며, coliphage T₁이 coliphage T₅보다 粘土에 흡착되는率在 높았다.
5. pH가 낮을수록 phage는 粘土에 잘 흡착되어 pH 4일 때는 pH 7일 때보다 最高 27배의 흡착률을 보였다.
6. 1가 ion(Na⁺)보다 2가 ion(Ca²⁺)은 4배에서 39배가량 phage의 흡착력을 보여주고, 3가 ion(Al³⁺)은 1가 ion(Na⁺)보다 17배에서 91배까지 흡착력을 높여주었다.
7. 有機物の 濃도가 높을수록 phage는 粘土에 흡착이 안되었다.
8. phage가 粘土에 흡착되는 것은 可逆的이며 溶出液으로서의 효과는 2차증류수 > 수돗물 > 淡水 > 海水의 순서로 좋았다.
9. 有機物の 濃도가 높을수록 粘土에 흡착되었던 phage가 잘 溶出되었다.
10. 멸균되지 않은 현탁액에서의 phage의 生存은 멸균된 현탁액에서의 生存보다 훨씬 떨어졌다.

引用 文 獻

1. 林應極, 朴順子, 鄭秀鎮, 金煥, 1980. 국내 점토 광물의 특성 연구 J. Korean. Ceramic. Soc Vol. 17 : 13~19.
2. 洪淳佑, 河永七, 李周植, 이진형, 강철희, 이영숙, 1981. 漢江汚染指標로서의 腸內細菌 및 비루스의 分布에 관한 研究
3. Adams, M.H., 1952. Classification of bacterial viruses: Characteristics of the T₂, C16 species. *J. Bacteriol.* 64 : 387~396.
4. Adams, M.H. and G.K.Lark. 1950. Mutation to heat resistance in coliphage T₅. *J. Immunol.* 64 : 335~347.
5. Agres, P.A., 1977. Coliphages and the marine environment: ed. by F.A. Skinner. *Aquatic Microbiology*. AP. 275~298.
6. Berg, G. and D.R. Dahling., 1980. Method for recovering viruses from river water solids. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 850~853.
7. Biscaye, P.E. 1955. Mineralogy and sedimentation of recent deep-sea clays in the Atlantic Ocean and adjacent sea and oceans. *Geol. Soc. Ann. Bull.* 76 : 803~832.
8. Bitton, G. and R. Mitchell. 1974. Effect of colloids on the survival of bacteriophages in sea water, *Water Research.* 8 : 227~229.
9. Bitton, G. 1975. Adsorption of viruses onto surfaces in acsl and water. *Water Research.* 9 : 473~484.
10. Bardley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31 : 230~314.
11. Bradley, D.E. 1962. The structure of coliphages. *J. Gen. Microbiol.* 31 : 435~445.
12. Bradley, D.E. and D. Key. 1960. The fine structure of Bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* 23 : 553~563.
13. Carlson, G.F., F.E. Woodard, D.F. Wentworth and O.J. Sproul. 1968. Virus inactivation on clay particles in natural waters. *J. WPCF.* 40 : R 89~106.
14. Cliver, D.O. 1968. Virus interactions with membrane filters. *Biotech. Bioeng.* 10 : 877~889.
15. Clowes, R.C. and W. Hayes. 1968. Experiments in microbial genetics. Blackwell Scientific publications.
16. Cookson, J.T. 1967. Adsorption of *E. coli* bacteriophage T₄ on activated carbon as a diffusion limited process. *Environ. Sci. Tech.* 1 : 157~160
17. Ewert, D.L. and M.J.B. Paynter. 1980. Enumeration of bacteriophages and host bacteria in sewage and the activated sludge treatment process. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 576~583.
18. Farrah, S.R., C.O., Gerba., C.Wallis. and J.L. Melnick. 1976. Concentration of viruses from large volumes of tap water using pleated membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 : 221~226.
19. Fass, R., Y. Straussman., A. Shahar and A. Mizrahi. 1980. Silicates as nonspecific adsorbents of bacteriophages: a model for purification of water from viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 39 : 227~232.
20. Fildes, P., and D. Kay. 1969. The conditions which govern the adsorption of a tryptophan-dependent bacteriophage to kaolinite and bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **30** : 183
 21. Gerba, C.P. and G.E. Schaiberger. 1975. Effect of particulates on virus survival in seawater. *J. WPCF.* **47** : 93~103.
 22. Geyal, S.M., K.S. Zerda, and C.P. Gerba. 1980. Concentration of coliphages from large volumes of water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **39** : 85~91.
 23. Heriott, R.M., and J.L. Barlow. 1952. Preparation, purification and properties of *E. coli* virus T2. *J. Gen. Physiol.* **36** : 17~28.
 24. Hurst, C.J., C.P. Gerba. and I. Cech. 1980. Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **40** : 1067~1076.
 25. Labelle, R.L., C.P. Gerba, S.M. Goyal and J.L., Melnick. 1980. Relationship between environmental factors, bacterial indicators and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **39** : 588~596.
 26. Landry, E.F., J.M. Vaughn, M.Z., Thomas and C.A., Beckwith. 1979. Adsorption of enteroviruses to soil cores and their subsequent elution by artificial rainwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **38** : 680~687.
 27. Landry, E.F., J.M. Vaughn, M.Z. Thomas and T.J. Vicalo. 1978. Efficiency of beef extract for the recovery of poliovirus from wastewater effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* **36** : 544~548.
 28. Moore, B.E., B.P. Sagile and J.F. Malina, Jr. 1975. Viral association with suspended solid. *Water Research.* **9** : 197~203.
 29. Niemi, M. 1976. Survival of *E. coli* phage T₇ in different water types. *Water Research.* **10** : 751~755.
 30. Scarpino, P.V., G. Berg, S.L. Chang, D. Dahling and M. Lucas. 1972. A comparative study of the inactivation of viruses in water by chlorine. *Water Research.* **6** : 959~965.
 31. Scarpino, P.V. 1978. Bacteriophage indicators. ed. by G. Berg. Indicators of viruses in water and food. Ann. Arbor Science.
 32. Shatter, P.T.B., T.G. Metcalf and O.J. Sproal. 1980. Chlorine resistance of poliovirus isolants recovered from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **40** : 1115~1121.
 33. Sharp, D.G., D.C. Young, R. Floyd and J.D. Johnson. 1980. Effect of ionic environment of the inactivation of poliovirus in water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **35** : 530~534.
 34. Sobsey, M.D., C.H. Dean, M.E. Knuckles and R.A. Wagner, 1980. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **40** : 92~101.
 35. Twarog, R. and C.E. Blouse. 1968. Isoation and characterization of transducing bacteriophage BPI for *Bacterium anitratum*. *J. Virol.* **2** : 716~722.
 36. Williams, R.C. and D. Fraser. 1953. Morphology of the seven T-bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* **66** : 458~464.
 37. Winklet, U., W. Ruger and W. Wackernagel. 1976. Bacterial, phage and molecular genetics. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

※: 본학회지는 산학협동재단의 보조금에 의하여 발간된 것입니다.