

## 하수역학 구축을 위한 시료 전처리 기술과 신속검출기술

이재엽<sup>1a,2a</sup> · 이복진<sup>1b,2b</sup> · 제스민아터<sup>1c,2c</sup> · 안창혁<sup>1d,\*</sup> · 김일호<sup>1e,2d\*</sup>

<sup>1</sup>한국건설기술연구원 환경연구본부 · <sup>2</sup>과학기술연합대학원대학교 건설환경공학과

## Pretreatment and Rapid Detection Methods for Wastewater-Based Epidemiology

Lee Jai-Yeop<sup>1a,2a</sup> · Lee Bokjin<sup>1b,2b</sup> · Jesmin Akter<sup>1c,2c</sup> · Ahn Chang Hyuk<sup>1d\*</sup> · Kim Ilho<sup>1e,2d\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environment Research, Korea Institute of Civil Engineering and Building Technology

<sup>2</sup>Department of Construction Environment Engineering, University of Science & Technology

(Received 22 November 2022, Revised 9 January 2023, Accepted 12 January 2023)

### Abstract

Wastewater Based Epidemiology (WBE) provides useful information not only on the use of illegal drugs in the community, but also on the presence of hygiene and health products and infectious pathogens in sewage facilities. As a consequence of the SARS-CoV-19 virus epidemic in 2019, monitoring the status of the infection is of utmost importance. SARS-CoV-19 was also detected in sewage, and the number and trend of infections in the community suggest that the application of the WBE system would be useful and appropriate. This study introduces a pre-treatment concentration method including viruses in sewage samples. A total of seven methods which were subdivided into methods for adsorption-extraction, ultra-filtration, PEG precipitation, and ultra-centrifugation, and the results for analyzing the recovery rates were included. Meanwhile, it is necessary to pay attention to rapid detection technologies which analyze infectious pathogens at the site of sewage facilities. These can include ELISA, FTIR, SERS, and biosensor based on the detection principle, and the characteristics, advantages, and disadvantages of each were summarized herein. If rapid detection technologies and accurate quantitative analyses are further developed, the use of sewage mechanics in response to pandemic viruses is expected to expand further.

**Key words** : Infectious pathogen, Pathogen Concentration, Rapid Forensic, SARS-CoV-19, Wastewater Based Epidemiology

<sup>1a,2a</sup> 수석연구원(Senior Researcher), 부교수(Associate Professor), pas2myth@kict.re.kr, <https://orcid.org/0000-0002-4663-1890>

<sup>1b,2b</sup> 연구원(Researcher), bokjinlee@kict.re.kr, <https://orcid.org/0000-0002-8832-5242>

<sup>1c,2c</sup> 연구원(Researcher), jesmin@kict.re.kr, <https://orcid.org/0000-0002-2263-2928>

<sup>1d</sup> Corresponding author, 수석연구원(Senior Researcher), chahn@kict.re.kr, <https://orcid.org/0000-0002-6761-0693>

<sup>1e,2d</sup> Corresponding author, 연구위원(Research Fellow), 교수(Professor), ihkim@kict.re.kr, <https://orcid.org/0000-0002-2136-7712>

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>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. Introduction

하수역학(Wastewater-Based Epidemiology, WBE) 2000년 대 이후 약물조사 분야에 주로 활용된 이후, 지역사회 건강에 관련된 다양한 인자들의 감식에 관여해 왔다. WBE 연구는 크게 약물류, 위생·건강용품, 전염성 병원균으로 분류된다(Eggimann et al., 2017).

최근 WBE 분야는 하수 네트워크에서 바이오마커의 분석을 통해 환경 위해성 조기 감지 및 평가에 대한 정보를 제공할 수 있는 유용한 툴로 인식되고 있다(Jho et al., 2019). 특히 공공보건안전 분야를 위협하는 감염성 병원균, 바이러스 등에 대한 정보를 실시간에 가까운 신속한 대응을 가능하게 할 것으로 기대되고 있다.

네덜란드, 미국에서는 COVID-19 팬데믹 관리 방안으로 하수 역학을 이용하여 유의미한 결과를 활용한 사례가 발표되고 있으며, 호주(Water Research Australia), 캐나다(Canadian Water Network)는 하수 내 COVID-19 추적 및 관리를 위해 모니터링 등의 연구분야에 예산을 편성 및 지원하고 있다(Water Journal, 2020).

국내에서도 COVID-19 하수역학에 대한 관심과 중요성이 제기되고 있다. 2020년 6월 국회입법조사처 발행한 기사에서는 「하수기반역학의 개념과 도입 과제」라는 주제로 팬데믹에 대비한 스마트시티에 하수역학을 적용한 정책 검토를 제안하였다(Kim, 2020). 2020년 5월 대구 하수처리장 조사에서는 COVID-19 검출로 무증상감염사례를 보고하였다(Water Journal, 2020).

하수 내 감염성 병원균 검출은 유해 정보를 필터링하기 위해 전처리 후에 분석한다. 즉, 시료 내의 COVID-19 등 미량의 감염성 병원균을 분석하기 위해서는 방해 물질의 영향을 줄여야 한다. 하수의 특성상 방해 물질이 다량 포함되어 전처리 과정을 거쳐야 하며, 이후에 DNA/RNA 시퀀스 정보를 증폭하여 분석한다. Ahmed 등은 하수처리시설 내 SARS-CoV-2의 검출을 위해 하수 시료에서 RNA 핵산을 추출하는 시료 전처리 과정을 정리하였다(Ahmed et al., 2020). 흡착-추출법, 한외여과막법, 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol, PEG) 침전법, 초고속원심분리법 등 원리에 따라 구분한 기본 4가지 방법에서 첨가물이나 막 유닛을 다르게 하여 총 7가지로 확장하였다. Ihara 등은 하수역학을 위해 하수 시료 내 SARS-CoV-2 검출 기술을 소개하였다(Ihara and Yasojima, 2021). 폐쇄형 집단지설과 직결된 맨홀에 직물형 샘플러를 설치하여 주기마다 시료를 회수한 후에 PEG 침전법으로 시료를 분석하였다.

국내에서도 하수 내 감염성 병원균에 대한 연구가 WBE 개념 하에 이루어지고 있다. 2020년 대구 하수처리장 조사 외에 2022년 3월부터 경기 하수처리장에서 COVID-19 바이러스를 검출한 사례를 보고하고 있다(Kim et al., 2022). 이미 하수 시료 내 미생물 분석 수준은 해외 WBE 관련 선진연구기관에 근접한 기술 수준을 보유하고 있다.

한편 감염성 병원균과 같은 생체 분자는 지역 보건환경에 광범위한 영향을 미칠 수 있으므로 사전에 최대한 신속하게 검출하는 것이 중요하므로, 이를 효과적으로 구현하기 위한

신속검출기술의 사전 검토가 우선적으로 필요하다.

본 연구에서는 하수 시료 내에서 감염성 병원균을 정량 검출하기 위한 전처리 방법을 소개하였다. 또한 바이오 마커를 신속하게 검출할 수 있는 4가지 접근법(ELISA, FTIR spectroscopy, SERS, 바이오센서 등)에 대한 특징과 장단점을 조사 및 비교하였다.

## 2. 감염성 병원균 정량 검출을 위한 시료 농축 방법

### 2.1 하수 내 미생물 분석 주요 과정

하수 내 미생물 정량 검출을 위한 방법은 시료 채취에서 시작한다. 미생물 중에서 주로 COVID-19와 같은 바이러스를 대상으로 하지만, 바이러스 역시 mRNA를 주형으로 역전사 효소와 DNA polymerase에 의해 cDNA(complementary DNA)로 합성하는 과정을 거쳐 DNA를 분석한다. 따라서 본 연구의 미생물은 바이러스 뿐 아니라 세균을 포함할 수 있다. 유입 하수 또는 1차 침전조의 원수는 100~250 mL, 2차 침전조나 방류조는 1~10 L을 채수한다(COVID-19 Taskforce, 2022). 이는 2차 침전조나 방류조에서 미생물 농도가 낮을 뿐 아니라 환경 시료에서 미생물 분석 대상이 되는 현탁물 또는 고형물의 함량이 낮기 때문이다.

냉장 상태로 시료를 이송하여 냉동 보관하거나 즉시 시료 농축과정을 진행한다. 시료 농축은 하수 내 분석 방해물질을 제거하는 과정이다. 전처리 이후에는 염기서열 분석을 위한 핵산 추출 과정을 수행한다. 바이러스 여부에 따라 RNA를 추출하고 그 외에는 DNA를 추출한다. Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction (AGPC)법으로 추출하거나 핵산 추출 키트를 사용하며, 두 방법을 결합한 방법을 사용하기도 한다.

추출된 DNA 또는 RNA는 중합효소연쇄반응 장치(Polymerase Chain Reaction, PCR)를 이용하여 분석하며 SARS-CoV-2에 관한 프라이머와 프로브 정보는 관련 문헌에 제시되어 있다(Ahmed et al., 2020; COVID-19 Taskforce, 2022).

따라서 하수 내 미생물 분석을 위한 기술 개발은 핵산 추출 바로 전단계인 시료 농축 과정이다. 관련 논문에서도 검출 감도나 회수율 확보를 위해 기술 개발을 집중하는 과정은 시료 농축 과정에 해당한다(Ahmed et al., 2020; Ihara and Yasojima, 2021).

### 2.2 하수 시료의 미생물 분석을 위한 전처리 방법과 회수율 비교

일본 수환경학회 COVID-19 Taskforce 연구팀은 하수 시료에서 미생물 유전자 분석을 위한 전처리 방법을 다음의 3가지로 구분하여 제시하였다(COVID-19 Taskforce, 2022).

- 음전하막과쇄법(Electronegative membrane-vortex method)
- 한외여과막(Ultra-filtration membrane)
- 폴리에틸렌글리콜 침전(Polyethylene glycol precipitation)

음전하막과쇄법은 혼합셀룰로오스막에 시료를 감압여과한 후 여과막을 교반자나 비드로 여과막을 파쇄한 후 유출액을 통해 유효 성분을 추출하는 방법이다(Haramoto et al., 2012). 이 방법은 하수내 SARS-CoV-2 바이러스 RNA 분석에도 이용되고 있다(Haramoto et al., 2020).

한외여과막법은 분자량 10~100 kDa의 물질을 여과막으로 여과하여 타겟으로 하는 유효 성분을 농축하는 방법이다. 네덜란드과 미국에서 하수중의 SARS-CoV-2의 검출에 한외여과막법이 사용되었다는 보고가 있다(Medema et al., 2020; Sherchan et al., 2020).

폴리에틸렌글리콜(PEG) 침전법은 바이러스를 포함한 단백

성분의 농축법이며 수용성의 폴리머 물질인 폴리에틸렌 글리콜과 시료 중의 단백 성분을 결합시킨 후 원심 후 침전물을 완충액으로 재부유하여 농축하는 방법이다. 하수 시료의 1차 농축이나 환경 샘플의 2차 농축법으로서 활용된다(Dovas et al., 2010; Hewitt et al., 2013; Thongprachum et al., 2018). COVID-19 Taskforce에서 소개한 방법은 Jones 연구진의 방법을 사용하였다(Jones and Johns, 2009).

Ahmed 등은 SARS-CoV-2의 하수역학 대응 위해 상기한 바이러스 농축 전처리 방법 3가지를 기본으로 시약이나 방법을 7가지로 세분하여 효율성을 테스트하였다(Ahmed et al., 2020). 핵산 추출 전단계인 전처리 과정에서 다음과 같은

**Table 1.** Main procedure of sewage sample concentration for microbial analysis

	Main procedure	Materials	Remarks
Electronegative membrane-vortex method (A, B, C)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Add 1mL of 2.5M MgCl solution per 100mL of sample to mix up and down</li> <li>Vacuum filtration with a mixed cellulose membrane with 0.8 μm of pore size</li> <li>Put 10mL of the elution buffer and a filtered membrane into a centrifugal tube containing an oval stirrer</li> <li>After stirring with vortex at maximum strength for 5 minutes, shred the membrane and recover the liquid to the centrifugal tube</li> <li>Add 5mL of the elution buffer and stir with vortex for 30 seconds to recover additional liquid</li> <li>Using a swing rotor, recover only the supernatants after centrifugation for 2,000×g for 10 minutes</li> <li>Filter with a 0.45 μm diameter syringe filter and concentrate by 5,000×g centrifuge for 5 minutes with Centriprep YM-50 (5,000×g 10 minutes for Amicon Ultra-15)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mixed cellulose membrane (0.8 μm)</li> <li>Vacuum filtration</li> <li>Elution buffer×100 (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O 2g, C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>3</sub> · 3H<sub>2</sub>O 3g, 1 mL Tween, DI 70 mL, pH 7.2)</li> <li>Oval stirrer, Vortex mixer</li> <li>Centrifuge, swing roter</li> <li>Syringe filter (0.45 μm)</li> <li>Centriprep YM-50 (10 kDa) or Amicon Ultra-15 (30 kDa)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ahmed et al. (2020) added nothing or acidifies to pH 4 using 2N HCl instead of adding MgCl solution</li> <li>For the Amicon Ultra-15, adjust the amount of elution buffer to 8+4 mL instead of 10+5 mL</li> <li>Ahmed et al. (2020) crashed the filtration membrane using bead crushing tubes contained in the RNA kit</li> </ul>
Ultra-filtration membrane (D, E)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Filter sewage samples with a hydrophilic PTFE membrane with a diameter of 0.2 μm (or omit)</li> <li>Put 120mL of filtrate in Centricon Plus-70 and centrifuge it for 1,900×g 8 minutes.</li> <li>Turn the unit upside down for 2 minutes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hydrophilic PTFE membrane (0.2 μm)</li> <li>Centricon Plus-70 (10 kDa) or Amicon Ultra-15 (30 kDa)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ahmed et al. (2020) centrifuges at 4°C for 10 minutes instead of filtrate and pretreats with supernatant. Centrifugal conditions vary depending on the filter membrane unit (Amicon Ultra-15 : 30 kDa, 4,500×g 10 minutes / Centricon Plus-70 10 kDa, 3,500×g 30minutes)</li> </ul>
PEG precipitation (F)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Add the sample to a centrifugal tube to be 10% w/v of PEG8000 and 2% w/v of NaCl (2 tubes)</li> <li>3,500×g, centrifuge for 5 minutes, discard the solid, and take the supernatant</li> <li>Overnight stirring in cooling shaker</li> <li>1,000×g, centrifuge for 30 minutes and resuspended with 500 uL phosphate buffer</li> <li>Centrifugal for several seconds and transferred the entire suspension to a 1.5 mL tube</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PEG8000</li> <li>NaCl</li> <li>Shaker with a cooling function or a shaker installed in a refrigerator</li> <li>Incubator</li> <li>Phosphate buffer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Replaceable phosphate buffer with suspended solids with similar functions such as Trizol</li> </ul>
Ultra-centrifuge method (F)	<ul style="list-style-type: none"> <li>After centrifugation for 1 hour at 4°C 100,000×g, the precipitate was dispersed in 3.5 mL of 0.5 N glycine buffer. incubation on ice for 30 minutes</li> <li>Neutralize by adding 3mL of 2×PBS. The supernatant is centrifugal purification at 4°C for 12,000×g for 15 minutes</li> <li>After centrifugation for 1 hour at 4°C 100,000×g, the precipitate is dispersed in 1×PBS 400 uL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ultra-centrifuge with a colling function</li> <li>glycine buffer</li> <li>Phosphate buffer</li> </ul>	-

7가지의 농축 방법을 사용하였다.

- A. 흡착-추출법 : 2N HCl을 이용하여 pH 4로 시료를 산성화
- B. 흡착-추출법 : 별도로 처리하지 않음
- C. 흡착-추출법 : 25 mM 농도가 되도록 MgCl<sub>2</sub>을 첨가
- D. 한외여과법 : 물질량 30 kDa을 배제하는 Amicon Ultra-15 유닛 사용
- E. 한외여과법 : 물질량 10 kDa을 배제하는 Centricon Plus-70 유닛 사용
- F. PEG 침전법
- G. 초고속원심분리법

상기 7가지 방법에 대한 주요 과정과 시약 및 기구, 참고 사항 등을 표 1에 정리하였다. 실험 과정은 수환경학회 매뉴얼을 기본으로 정리하였으며 참고 사항에 Ahmed 등이 제시한 방법과 다른점을 기재하였다. 수환경학회 매뉴얼에서는 음전하막과쇄법으로 되어 있는데 Ahmed 등의 연구에서는 흡착-추출로 표기하였다. 용어 상의 차이 뿐 아니라 Ahmed 등은 고형물이 흡착된 막을 RNA 추출 키트에 포함된 비드 파쇄 튜브를 활용하여 추출하였고, 수환경학회 매뉴얼에는 별도의 타원형 교반자를 사용하여 막을 파쇄하는 점이 실제로 차이점을 보였다.

회수율 평가는 쥐 간염 바이러스 (Murine Hepatitis Virus, MHV)를 주입하여 실험하였다. 하폐수 내 바이러스가 이전까지는 비외피성 바이러스에 대해 연구되었으나 MHV는 SARS-CoV-2와 같은 외피성으로 사용하였다. 회수율 결과를 그림 1에 나타내었다. 회수율이 가장 높은 방법은 C, B, D순으로 셀룰로오즈막을 이용한 흡착-회수 방법과 한외여과막법이 상대적으로 높은 것으로 관찰되었다.

### 2.2.1 SARS-CoV-2 바이러스 모니터링

Ihara 등은 2020년 10월부터 하수처리장 1차 침전조에서

채수한 하수 시료 내의 SARS-CoV-2 바이러스를 분석하였다 (Ihara and Yasojima, 2021). 분석 방법은 PEG 침전법이었으며 후술하는 방법론에 의하면 양성율 방법을 써서 검출한계까지 정량 분석에 도달하였다. 즉, 채수한 시료가 정량 하한치인 10<sup>1</sup> copies/reaction인 경우 기존의 연구는 양성-음성 여부만을 제시하였다.

Ihara 등은 정량 하한치 수준에서 검출을 정량적으로 도출하기 위해 동일 시료를 12웰로 분주하여 양성율로 검출량을 산정하였다. 즉, 타겟 배열이 포함된 올리고 DNA의 검량선 범위를 정량 하한치 근처인 0.1~20 copies/reaction 범위로 조정하여 12개 중 양성인 나온 웰을 계수하여 양성율로 나타낸 것이다. 양성율은 검량선 범위 내 copies/reaction 수치와 푸아송 분포로 나타낼 수 있었으며 잘 일치하였다(그림 2a). 실제 하수 내 SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 모니터링에서도 3웰의 qPCR을 2회 반복하여 총 6회로 양성율을 카운트하였다. 그 결과, 동일 시간대의 지역 감염자수와 상당히 일치하여 하수역학의 데이터 수집 방법으로 활용할 수 있음을 시사하였다(그림 2b).

## 3. 신속검출기술

### 3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA는 항원과 항체 간의 특이적 결합 반응에 대한 활성강도와 양을 정량적으로 측정하는 방법이다. 이 접근법은 단백질, 항원과 같은 가용성 표적 물질을 정량하기 위한 효소 면역분석법에 기초한 혈청학적 분석법(serological method)을 기반으로 한다. ELISA 방식은 대상 시료에 환경 조건이 충분하면 반응이 비교적 쉽게 일어난다는 장점이 있어 비교적 신속하고 간편하게 정량 측정이 가능하다. 이는 항원을 검출하는 방법에 따라 크게 세가지 방법(e.g., direct, indirect, sandwich)이 있으며, 항체의 종류(e.g., monoclonal, polyclonal)에 따라 다양한

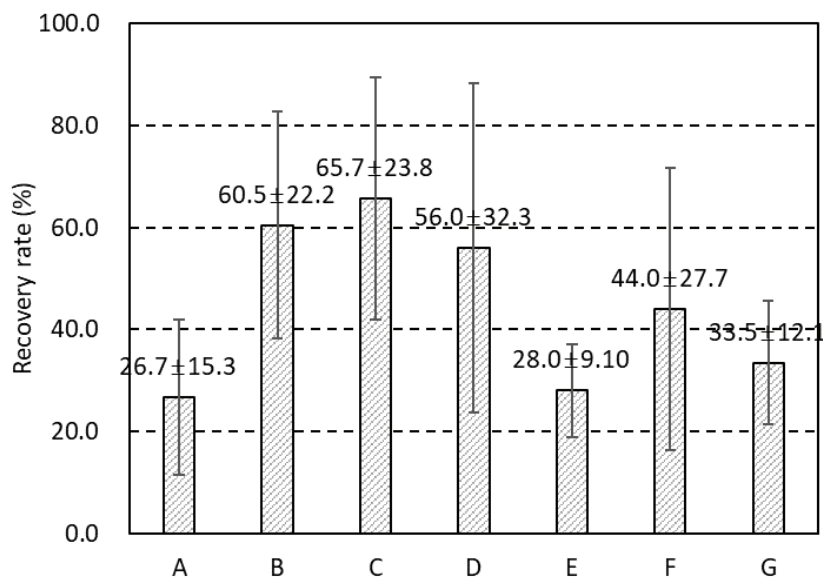
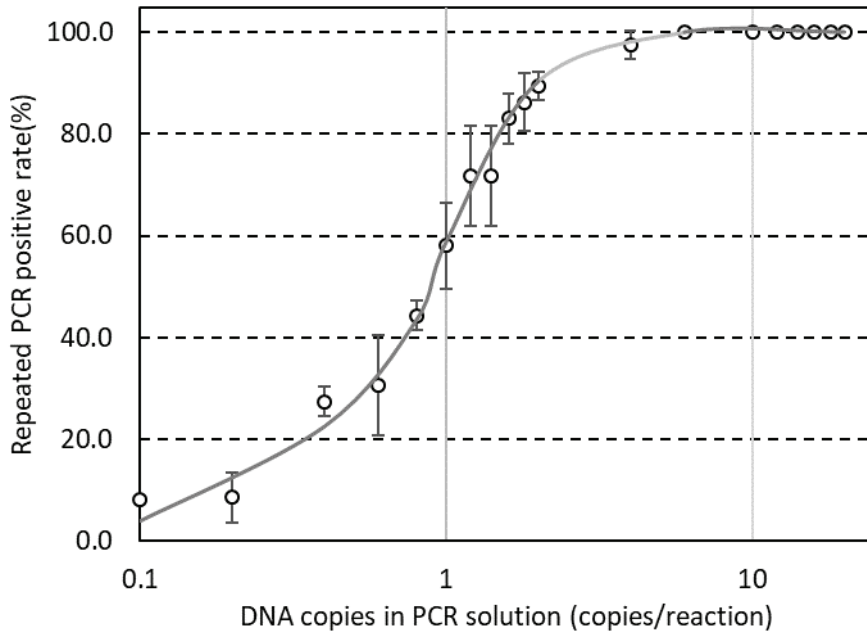
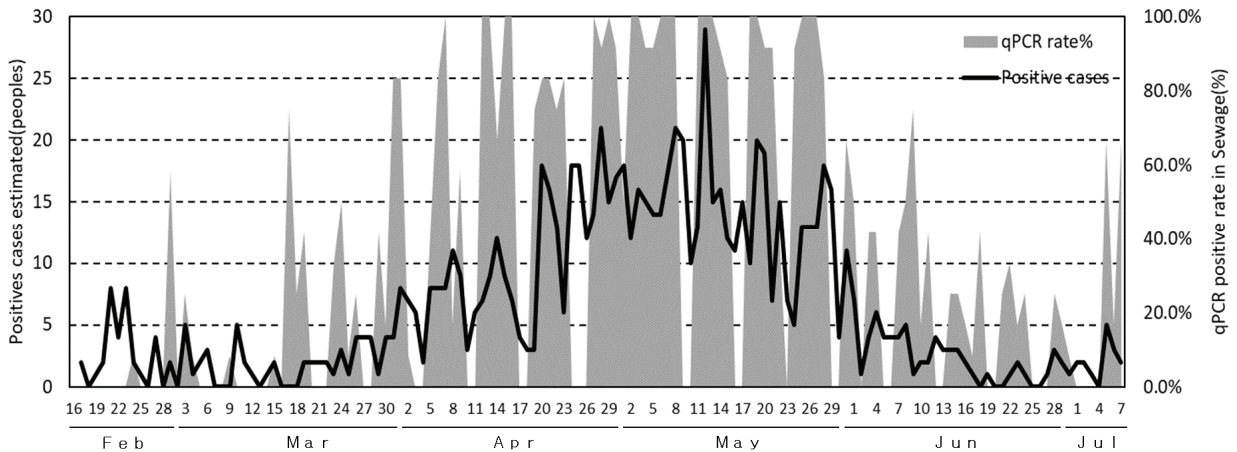


Fig. 1. Recovery rate by 7 concentration pretreatment methods (referred from Ahmed et al., 2020).





a. DNA copies vs. Positive case counts



b. DNA analysis vs. Positive case counts

Fig. 2. DNA copies analysis in sewage and positive case counts in regions (referred from Ihara and Yasojima, 2021).

조합이 가능하다. Dhamad and Rhida (2020)는 indirect ELISA 방법이 SARS-CoV-2 바이러스의 재조합 단백질 항원의 검출에 상대적으로 대중적면서도 양호한 민감도를 나타낸다고 보고하였다.

일반적으로 ELISA에 분석에 사용되는 시료는 세포 배양액 및 추출물, 타액, 혈액 성분 등을 포함한 생리적 대사산물(physiological metabolites)으로 알려져 있다. 하지만 많은 경우에 효율적인 정량을 위해서는 표적 물질을 배제한 시료의 배경농도를 낮추는 노력이 필요하다. 이를 위해서는 버퍼 용액이나 배지 등을 사용하여 배경 농도를 줄이거나 불순물을 응고 또는 배제시켜 표적 물질을 구분하는 전처리 작업이 필요하다. 특히 유/무기물의 복합체를 이루고 있는 하수 시료의 경우는 높은 배경 농도와 불순물들이 포함되어 있을 것으로 예상되므로 적절한 전처리 기법이 필수적일 것으로 판단된다.

ELISA 원리에 기반한 lateral flow assay는 우리에게 익숙한 COVID-19 자가진단키트의 형태이며, 짧은 시간 이내에 특정 항체/항원이 코팅된 멤브레인 띠의 발색 반응을 통해서 특이결합반응을 식별할 수 있는 신속검출방법이다. 이는 RT-PCR 대비 적은 시료량, 간편한 식별, 높은 경제성, 편의성 등의 장점이 있지만 어려운 정량분석과 상대적으로 낮거나 큰 범위의 민감도(10-90%)를 보이는 점은 단점으로 꼽힌다(Dhamad and Rhida, 2020; Lee, 2021). 그럼에도 불구하고 이러한 방법은 바이러스 농도가 높은 감염 초기의 유증상자를 식별하거나 백신 투여 후에 생성되는 항체의 존재 유무를 확인하는데 유용하게 활용될 수 있으므로(Lee, 2021), 하수 감식 측면에서 타겟물질인 병원성 감염균이나 바이러스를 조기에 판별할 수 있는 접근법으로 가능하다고 판단된다.

### 3.2 Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

FTIR spectroscopy는 특정 파장 범위에서 적외선에 의해 야기된 분자의 진동 측정을 기반으로 하는 물리화학적 방법이다. 측정 원리는 IR radiation이 샘플을 통과할 때 재료의 화학적 결합(chemical bond)이 가지는 진동 특성에 따라 특정 파장이 흡수되는데, 이는 대부분의 분자가 일정 흡광도 주파수 범위(400-4000  $\text{cm}^{-1}$ )와 주요 분자 진동과 특정 작용기(functional groups)를 가지는데서 비롯된다. 이러한 점을 이용하여 FTIR spectroscopy는 미생물 그룹을 분별할 때 특이적이고 민감하게 균주 수준까지 미생물의 식별이 가능하므로, 다양한 공중 보건에서 일상적인 역학 조사를 위한 유망한 진단 도구로 활용될 수 있다.

미생물 수준에서 FTIR spectroscopy의 측정은 대상 샘플 복합체에서 다양한 화학기반 분석을 수반한다. 일반적으로 미생물들은 복잡한 세포벽/막 구성을 가지며 이는 종(species)과 strain level에 따라 상이하므로 분자 결합 및 작용기 종류에 따라 특정 스펙트럼의 분별이 이론적으로 가능하다. 예를 들면, *Staphylococcus*와 같은 그람양성균의 경우는 peptidoglycan이 40-80%를 차지하지만, *E. coli*와 같은 그람음성균은 10% 수준이며, 내막에 일부 인지질(phospholipids)을 함유하고 있어 분광학적인 분류가 가능하다(Davis and Mauer, 2010).

FTIR spectroscopy의 장점은 시료량이 적고, 비교적 빠르고, 사용이 간편한 비파괴적 방법일 뿐만 아니라 다양한 형태의 샘플도 검출이 가능한 점이다. 특히, IR spectra의 주요 영역이 가지는 특징으로 지문 영역(fingerprint region)을 측정할 수 있는 점은 ELISA 접근법 대비 높은 식별력을 가진다고 볼 수 있다. 일반적으로 미생물 분석 시에는 탄수화물 구성에 의존하는 경향이 있으므로 해당영역(1200-900  $\text{cm}^{-1}$ )의 미세한 변화를 잘 이해할 필요가 있다(Martak et al., 2019). 하지만 FTIR spectroscopy의 측정은 작은 변화에도 스펙트럼의 변화를 일으킬 수 있으므로 배경 및 다중 스캔이 필요하며, 특히, 하수 시료의 경우는 복잡한 매트릭스 구조를 가지므로 적절한 전처리나 해석절차 없이는 중첩 스펙트럼이 생성되어 결과의 오류가 나타날 수 있다. 또한, 이러한 점들을 예방하기 위해서 순수한 표적 물질에 대한 스펙트럼 라이브러리의 구축이 선행되어야 하며 전반적인 운영과 해석의 전문성이 요구되는 점은 한계점으로 꼽힌다.

### 3.3 Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)

SERS는 나노크기의 금속표면에 물질을 흡착시켜 검출하기 어려운 라만산란 신호의 증폭을 유도하여 표적 물질에 대한 세부정보를 얻기 위한 고감도 분석기법이다. SERS는 빛이 파장보다 작은 크기의 나노금속표면에서 발생하는 전자들의 집단 진동 현상인 표면 플라즈몬(surface plasmon)에 의한 전자기장의 증폭(amplification)에 따라서 신호를 증가시키는 원리를 따른다. SERS는 나노금속을 촉매제로 활용하기 때문에 표적물질의 분자 구조를 나노금속구조의 표면과 접촉 또는 근접하게 유지하는 것이 중요하다. 분석물의 라만산란은 localized surface plasmon resonance (LSPR)에 의해 생

성된 강한 전자기장 내에 위치할 때 크게 향상될 수 있기 때문이다(Wang et al., 2021). Wei et al. (2018)는 silver colloidal nanoparticles (AgNPs)을 이용하여 SERS 785 nm 조건에서 성공적으로 세 종류의 감염성 병원균(*E. coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella*)들을 식별하였다. 이러한 방법은 일반적인 라만 분석으로는 얻기 힘든 물질에 대한 정보 획득이 가능함을 시사한다.

SERS 기법은 분자마다 고유의 신호변환(signal transduction) 기작에 따라 다양한 화학물질부터 미생물 대사산물까지 감도 높은 선택적인 분자식별을 위한 생화학적 응용연구에 주로 이용된다. SERS의 장점은 FTIR spectroscopy와 유사하게 시료 준비가 간단하며 비교적 빠르고 사용이 간편한 비파괴적 방법일 뿐만 아니라 샘플의 구체적인 구성성분과 화학적 정보 획득이 가능한 점이다. 이는 매우 좁은 피크밴드 폭으로 인해 분해능이 높아 세밀한 분자단위의 생화학 분야에 적합하지만 한편으로는 나노 구조체를 이용하기 때문에 대부분의 큰 타겟물질의 검출에는 불리할 수 있다. 이 기법의 기능을 개선하기 위해서는 SERS의 전자기적 증강효과를 위한 재현성 있는 금속나노구조 물질과 그 표면 제조기술이 필요하다. 또한 향후에는 이 분광학적 결과를 이용하여 교차분석 및 시각화가 가능한 기계학습, 데이터 처리와 같은 접근법이 요구될 수 있을 것이다.

### 3.4 바이오센서

바이오센서는 바이오수용체(bio-receptor)와 신호변환기(transducer)의 생물학적 요소와 물리화학적 탐지기를 결합한 형태의 생물 화학적 공학 장치이다. 바이오센서의 컨셉은 의료, 보건 분야에서 신속검출을 위해서 일찍이 활용되어져 왔으며, 병원성 미생물이나 바이러스의 검출을 위해서 다양한 원리(질량감응, 전기화학적, 전류전압, 광학)를 응용하여 연구되어져 왔다. 이는 넓은 의미에서 앞서 언급한 ELISA, FTIR spectroscopy, SERS 기법 이외에도 RT-PCR과 같은 간접 센싱 기법을 포함하지만 주로 프로브를 이용한 간편한 검출 기술에 주안점을 두고 있다.

하수 시료의 바이러스는 나노 수준의 크기, 불연속 분포 및 낮은 감염 용량으로 인해 수환경 샘플에서 가장 검출하기 어려운 병원체 중 하나이므로, 바이오센서 접근법은 비록 실용화 초기단계임에도 불구하고 기존의 PCR 방법의 한계점이었던 시간적, 경제적 문제를 보완할 수 있는 대안 중 하나로 간주되고 있다(Pilevar et al., 2021).

바이오센서 기술은 신속 측정, 용이한 휴대성, 실시간 감지가 가능할 뿐만 아니라 전기 신호로 운영될 시 시료 내 탁도나 형광 화합물의 간섭을 받지 않는 장점이 있다. 하지만 복잡한 환경에서 낮은 안정성과 재현성을 보이며, 장시간 사용시 간섭종의 비특이적 흡착으로 인한 민감도와 특이도가 감소할 수 있는 점은 단점으로 꼽힌다. 하지만 조작 편의성과 저전력으로도 운전이 가능함을 감안할 때 환경매질에서 통합적 활용이 용이하기 때문에 실시간 현장분석에서 고려될 수 있는 기법으로 판단된다.

이상 신속검출기술로 살펴본 ELISA, FTIR spectroscopy, SERS, Biosensor의 원리와 장단점을 정리하여 표 2에 나타내었다.

**Table 2.** Comparative example of various rapid detection technologies

Description	Principle	Source	Advantages	Disadvantages
ELISA	Enzyme chemical reaction according to specific interaction of antigen and antibody	<ul style="list-style-type: none"> <li>Protein composition including food, patient saliva, and blood</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Efficient method for isolating and purifying target substances and easy to set up</li> <li>Simple and can take very little time</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Depending on the sample type, the background may be high and selective extraction is required to avoid cross-reactivity</li> </ul>
FTIR spectroscopy	Measuring vibrations of molecules caused by infrared light in a specific wavelength range	<ul style="list-style-type: none"> <li>Surface structure of microbial and other materials</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Recognition due to fingerprint region analysis of surface functional groups</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Operation required for prevention and interpretation of overlapping bands</li> </ul>
SERS	Surface-sensitive technique that enhances Raman scattering by molecules adsorbed on nanostructures	<ul style="list-style-type: none"> <li>Various biochemical metabolites</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No organic fluorescent material self-decomposition</li> <li>Narrow peak bandwidth and high resolution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Large target materials in nanostructures are disadvantageous for electronic field enhancement</li> </ul>
Biosensor	Combining a bio-receptor and a signal transducer to measure a signal in an environmental medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>Various environmental media including water</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fast, high-sensitivity, low-cost, real-time detection, simple and portable device</li> <li>Can be operated in a structure that does not receive external interference depending on specific structure</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Low stability and reproducibility in complex physiological environments</li> <li>Decreased sensitivity due to non-specific adsorption of interfering species</li> </ul>

#### 4. Conclusion

본 연구에서는 하수역학 구축을 위한 데이터 수집 기술로서 시료의 전처리 농축과정과 현장 신속검출을 중심으로 하수 내 바이러스 분석 방법을 검토하였다. 본 연구를 통해 얻은 결론을 다음과 같이 정리하였다.

- 1) 하수 내 미생물 분석을 위한 시료 농축은 흡착-추출법, 한외여과법, PEG 침전법, 초고속원심분리법 등 4가지 방법이 있으며 흡착-추출법에서 3가지, 한외여과법에서 2가지를 세분하여 모두 7가지 방법을 확인할 수 있었다. MHV를 주입하여 회수율을 평가한 결과 흡착-추출법과 한외여과법이 상대적으로 높은 성능을 보였으며, SARS-Co-V-2 바이러스 대상 실험에서는 PEG 침전법 역시 유효한 것으로 확인되었다.
- 2) 양성을 판정에 의한 정량 분석 결과는 지역 감염자수 추이와 상당히 일치하여 하수역학을 이용한 방역 체계 방법으로 활용될 수 있음을 시사하였다.
- 3) 4가지 신속검출기술을 검토한 결과, 이들은 주로 타겟 물질의 특정인식요소에 대한 생화학적 친화성이나 반응기작을 이용하여 분석, 검출, 정량하는 접근법을 기반으로 하고 있었다. 전반적으로 복잡한 하수 시료를 모니터링하기 위해서는 교차 반응성을 피하기 위한 선택적 추출, 배경물질이나 환경변화를 고려한 다중 스캔, 샘플의 적절한 분리 및 정제가 필요하거나 증첩 스펙트럼을 배제할 수 있는 전문적인 해석기술 등이 수반되어야 할 것으로 판단되었다.

- 4) 하수 원수는 연속적이고 복잡한 유기물 집합체이므로 하수역학에 요구되는 신속검출기술을 개발하기 위해서는 각 기술들의 장점들은 유지하면서 불필요한 기질들은 분리 또는 정제할 수 있는 간편하고 신속한 전처리 또는 샘플링 기술의 개발이 병행되어야 할 것으로 판단되었다.

#### Acknowledgment

The authors are very grateful for the funds [Project, NRF-2021K1A4A8A01079319] provided by the “National R&D Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science and ICT”.

#### References

- Ahmed, W., Bertsch, P. M., Bivins, A., Bibby, K., Farkas, K., Gathercole, A., Haramoto, E., Gyawali, P., Korajkic, A., McMinn, B. R., Mueller, J. F., Simpson, S. L., Smith, W. J. M., Symonds, E. M., Thomas, K. V., Verhagen, R., and Kitajima, M. (2020). Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater, *Science of The Total Environment*, 739, 139960.
- COVID-19 Taskforce. (2022). *Detection manual for SARS-CoV-2 RNA in wastewater*, Japan Society on Water Environment & Japan Institute of Wastewater Engineering and Technology.



- Davis, R. and Mauer, L. J. (2010). *Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria, current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology Vol. 2*, Formatex Research Center, Spain, 1582-1594.
- Dhamad, A. E. and Rhida, M. A. A. (2020). COVID-19: molecular and serological detection methods, *Peer J* 8, e10180.
- Dovas, C. I., Papanastassopoulou, M., Georgiadis, M. P., Chatzinasiou, E., Maliogka, V. I., and Georgiades, G. K. (2010). Detection and quantification of infectious avian influenza A (H5N1) virus in environmental water by using real-time reverse transcription-PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2165-2174.
- Eggimann, S., Mutzner, L., Wani, O., Schneider, M. Y., Spuhler, D., Moy de Vitry, M., Beutler, P., and Maurer, M. (2017). The potential of knowing more: A review of data-driven urban water management, *Environmental Science & Technology*, 51(5), 2538-2553.
- Haramoto, E., Katayama, H., Asami, M., and Akiba M. (2012). Development of a novel method for simultaneous concentration of viruses and protozoa from a single water sample, *Journal of Virological Methods*, 182(1-2), 62-69.
- Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O., and Kitajimac, M. (2020). First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan, *Science of The Total Environment*, 731, 140405.
- He, Q., Gao, L., Wang, Z., Tang, Y., Pan, B., and Li, M. (2021) Fluorescence characteristics of dissolved organic matter in several independent water bodies: possible sources and land-use effects, *Environmental Science and Pollution Research*, 28(25), 33241-33253.
- Hewitt, J., Greening, G. E., Leonard, M., and Lewis, G. D. (2013). Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment, *Water Research*, 47, 6750-6761.
- Ihara, M. and Yasojima, M. (2021). Wastewater-based Epidemiology for SARS-CoV-2 in wastewater treatment plant and individual buildings in Kinki region, *Journal of Japan Society on Water Environment*, 44(A)(11), 364-369.
- Jho, E., Kim, H., Choi, Y., Lee, Y., and Kim, G. (2019). Wastewater-based epidemiology for the management of community lifestyle and health: An unexplored value of water infrastructure, *Journal of the Korean Society of Water and Wastewater*, 33(1), 63-77. [Korean Literature]
- Jones, T. H. and Johns, M. W. (2009). Improved detection of F-specific RNA coliphages in fecal material by extraction and polyethylene glycol precipitation, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6142-6146.
- Kim, K. (2020). Concepts and introduction tasks of wastewater based epidemiology, 1724, National Assembly Research Service, 1-4. [Korean Literature]
- Kim, K., Kim, M., Park, S., and Ryu, J. (2022). SARS-CoV2: Behavior of infectious pathogen in Wastewater-based epidemiology, *Proceeding Book of Korean Water and Wastewater Society · Korean Water Environment Society Joint Conference, Journal of Korean Society on Water Environment*, SP.VIII-2. [Korean Literature]
- Lee, C. S. (2021). The usefulness of the COVID-19 rapid diagnosis kit, *Korean Journal of Healthcare-associated Infection Control and Prevention*, 26(2), 134-136. [Korean Literature]
- Martak, D., Valot, B., Sauguet, M., Chollet, P., Thouverez, M., Bertrand, X., and Hocquet, D. (2019). Fourier-transform infrared spectroscopy can quickly type gram-negative Bacilli responsible for hospital outbreaks, *Frontiers in Microbiology*, 10, 1440.
- Medema G., Heijnen L., Elsinga G., Italiaander R., and Brouwer A. (2020). Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in The Netherlands, *Environmental Science & Technology Letters*, 7(7), 511-516.
- Meng, F., Huang, G., Yang, X., Li, Z., Li, J., Cao, J., Wang, Z., and Sun, L. (2013) Identifying the sources and fate of anthropogenically impacted dissolved organic matter (DOM) in urbanized rivers, *Water Research*, 47(14), 5027-5039.
- Murphy, K. R., Boehme, J. R., Noble, M., Smith, G., and Ruiz, G. M. (2009) Deducing ballast water sources in ships arriving in New Zealand from southeastern Australia, *Marine Ecology Progress Series*, 390, 39-53.
- Pilevar, M., Kim, K. T., and Lee, W. H. (2021). Recent advances in biosensors for detecting viruses in water and wastewater, *Journal of Hazardous Materials*, 410, 124656.
- Sherchan, S. P., Shahin, S., Ward, L. M., Tandukar, S., Aw, T. G., Schmitz, B., Ahmed, W., and Kitajima, M. (2020). First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA, *Science of The Total Environment*, 743, 140621.
- Tang, J., Li, X., Cao, C., Lin, M., Qiu, Q., Xu, Y., and Ren, Y. (2019) Compositional variety of dissolved organic matter and its correlation with water quality in peri-urban and urban river watersheds, *Ecological Indicators*, 104, 459-469.
- Thongprachum, A., Fujimoto, T., Takanashi, S., Saito, H., Okitsu, S., Shimizu, H., Khamrin, P., Maneekarn, N., Hayakawa, S., and Ushijima, H. (2018). Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan, *Infection, Genetics and Evolution*, 63, 17-23.
- Wang, W., Kang, S., and Vikesland, P. J. (2021). Surface-enhanced raman spectroscopy of bacterial metabolites for bacterial growth monitoring and diagnosis of viral infection, *Environmental Science & Technology*, 55, 9119-9128.
- Water Journal (2020). *Wastewater based epidemiology in preparation for the post-COVID-19 era : Part 01. Post-Corona Era: Sewage Knows COVID-19?!*, <http://www.waterjournal.co.kr/news/articleView.html?idxno=51277> (accessed Aug. 2022).
- Wei, C., Li, M., and Zhao, X. (2018). Surface-enhanced raman scattering (SERS) with silver nano substrates synthesized by microwave for rapid detection of foodborne pathogens, *Frontiers in Microbiology*, 9, 2857.



Zhang, Y. and Liang, X. (2019) Understanding organic nonpoint-source pollution in watersheds via pollutant indicators, disinfection by-product precursor predictors, and composition of dissolved organic matter, *Journal of Environmental Quality*, 48(1), 102-116.

Zhao, Y., Song, K., Wen, Z., Fang, C., Shang, Y., and Lu, L. (2017) Evaluation of CDOM sources and their links with water quality in the lakes of Northeast China using fluorescence spectroscopy, *Journal of Hydrology*, 550, 80-91.