동절기 자연수계 환경에 노출된 크립토스포리디움의 활성 및 감염성 변화

박상정[†] · 정일진*

국립환경과학원, *인천시 보건환경연구원
(2008. 9. 16. 접수/2008. 9. 29. 수정/2008. 10. 14. 채택)

Variation of Viability and Infectivity of *Cryptosporidium* Exposed to River Environments During Winter

Sangjung Park[†] · Iljin Jung*

National Institute of Environmental Research

*Incheon Metropolitan city Institute of Health and Environments

(Received September 16, 2008/Revised September 29, 2008/Accepted October 14, 2008)

ABSTRACT

This study was designed to establish the time frame of viability and infectivity of *Cryptosporidium*, when the *Cryptosporidium* is discharged to the aquatic environment. Changes in viability and infectivity of *Cryptosporidium* in relation to temperature and pH were investigated during winter (Dec 05-Feb 06) using semipermeable cellulose tubes containing infective *Cryptosporidium*. Infectivity was maintained at 50% after 30 days and almost completely lost after 50 days. It was also established that viability was maintained at about 8% after 90 days.

Keywords: *Cryptosporidium*, viability, infectivity

I. 서 론

크립토스포리디움(*Cryptosporidium* sp.)은 염소에 대한 내성이 매우 강하여 일반적인 정수처리공정으로는 제거가 되지 않아, 정수처리가 부적절한 경우에는 대형 오염사고의 원인이 되기도 한다(Mackenzie *et al.*, 1994). 크립토스포리디움에 감염될 경우, 건강한 사람에게서는 경미한 증상만 나타나지만, 일반적으로 설사, 복통, 구토 등을 일으킨다. 특히, AIDS환자 또는 어린이와 같이 면역력이 떨어지는 사람에게서는 사망에 이르는 등 치명적인 결과를 야기하기도 한다(Fayer, 1997).

크립토스포리디움은 일반적으로 자연환경에서 저항성이 강한 난포낭(oocyst)의 형태로 존재하여 오랫동안 사멸되지 않고 활성을 유지한다(Carey *et al.*, 2004).

여러 가지 환경요인 중 온도가 크립토스포리디움의 활성 및 감염성에 미치는 영향에 대한 연구결과를 보

면, BALB/c mouse를 이용하여 감염성 조사를 한 결과, 10°C~30°C의 물에 336시간 동안 난포낭을 방치하였더니 감염성이 유지되었으며(Fayer *et al.*, 1996), 72.4°C 이상에서 1분 또는 64.2°C에서 2분 이상 처리하면 감염성이 소실되었고, 59.7°C에서 5분 배양하면 감염성이 유지되었다(Fayer, 1994). DAPI/PI 방법으로 크립토스포리디움의 활성을 조사한 결과, -22°C에서 21시간동안 노출시키면 67%가 사멸되었으며, 152시간동안 노출시키면 90% 이상이 사멸되었다(Robertson *et al.*, 1992). 또한, -4°C 및 4°C 조건의 멸균수에서는 12주 이상동안 활성과 감염성이 유지되었다(Olson *et al.*, 1999).

그러나, 이와 같은 실험실에서의 인공적인 조건에서 노출된 실험결과는 크립토스포리디움이 자연 환경에 노출되었을 경우의 결과와는 또 다를 것이다. 자연 환경 조건에서의 크립토스포리디움 생존에 대한 연구에서는 실온의 흐르는 수돗물과 하천수에 각각 176일 동안 노출되었을 경우, DAPI/PI 방법에 의한 활성을 조사한 결과, 각각 96%, 94%가 사멸하였음을 밝혔다(Robertson *et al.*, 1992).

[†]Corresponding author : National Institute of Environmental Research
Tel: 82-32-560-7311, Fax: 82-32-568-2053
E-mail : parkjoe@me.go.kr

또한, 하천수에서 크립토스포리디움의 존재유무를 세 포배양법으로 확인한 결과, 4°C 및 10°C에서 14주 동안 노출시킨 경우, 감염성이 유지된 반면, 21~23°C에서 12 주 동안 노출시킨 경우에는 거의 감염성이 소실되었다 고 하는데(Pokomy *et al.*, 2002), 이는 크립토스포리 디움의 감염성이 낮은 온도에서 더 오래 유지되며, 상 온에서 난포낭이 더 빨리 불활성된다는 연구결과라고 할 수 있다(Fayer *et al.*, 1996; Pokomy *et al.*, 2002). 그 로 인해 하천에서 수온이 높은 하절기보다는 동절기에 크립토스포리디움의 개체수가 높게 나타나는 것으로 추측된다.

본 연구는 크립토스포리디움의 개체수가 높게 나타나 는 동절기(2005년 12월~2006년 2월)동안 감염성있는 크립토스포리디움을 반투막성의 셀룰로오즈 튜브 (cellulose tube)에 넣고 하천수에 노출시켜 자연적인 수온 및 pH 환경의 변화에 따른 크립토스포리디움의 활성 및 감염성이 어떻게 변화하는지를 파악하고자 하 였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험장치

공경(pore size)이 0.1 µm인 반투막성의 셀룰로오즈 튜브에 감염성이 있는 크립토스포리디움(*Cryptosporidium parvum*) 난포낭 10⁶ 개체수(10⁶/4 mL)를 넣고 인 천시 상수도사업본부 부평정수사업소내의 실험실에 설 치된 2중 격막이 있는 반응조에 설치하였다. 원수는 팔 당과 풍납의 취수원이 혼합되어 반응조로 들어오게 되 어 있으며, 원수에 포함되어 있는 잔류염소는 정량펌프 에 의해 2% 티오황산나트륨 용액과 접촉하여 제거되 도록 하였다. 잔류염소가 제거된 원수는 반응조 하단부 를 통해서 첫 번째 격실로 이동되어져 부피가 비교적 큰 부유물이 제거되어진 채 반응조의 상단부에서 월류 되어 두 번째 격실로 이동한다. 두 번째 격실에 크립토 스포리디움을 포함한 셀룰로오즈 튜브가 수면 위로 떠 오르지 않도록 추를 달고 연속적으로 하천수에 노출되 도록 설치하였으며, 셀룰로오즈 튜브 내의 크립토스포 리디움(*Cryptosporidium parvum*)이 담긴 내용물은 7일 간격으로 새로운 튜브로 교체하였다.

2. 수질분석

실험장치를 설치한 날로부터 실험을 끝마칠 때까지 4시간 간격으로 매일 6회 동안 탁도(Hach 2100P), 수 온, pH(Orion)를 먹는물 수질공정시험방법(환경부, 2007)에 따라 분석하였다.

Fig. 1. Schema of reactor used in this study.

3. 크립토스포리디움 활성 및 감염성 분석

1) 탈낭법(in vitro excystation)

각 시료를 acidified HBSS(pH 2.75)를 첨가하여 37°C에서 1시간동안 배양한 후, HBSS(pH 7.2)를 사용 하여 12,500 g에서 5분간 3회 원심분리하여 난포낭을 씻어내고 난포낭 농축액을 0.1 mL로 맞추었다. 이 시료 에 0.44% Sodium bicarbonate 50 µL 및 Hank's minimal essential medium(1% bile) 200 µL를 첨가하 여 충분히 혼합한 후, 37°C에서 1시간 배양하였다 (Campbell *et al.*, 1992). 이 시료를 일정량 취하여 현미 경 1,000배에서 DIC(Differential interference contrast) 로 난포낭의 내부구조를 확인하였으며, 좀 더 정밀한 확 인을 위해 상기시료에 0.4 mg/L DAPI(4',6-diamidino-2- phenylindole)로 형광염색을 한 후, 형광현미경 1,000배 에서 DAPI 형광염색결과와 DIC을 비교 관찰하였으며, 약 500개 이상의 난포낭을 계수하여 크립토스포리디움 의 활성을 측정하였다.

2) HCT-8 세포를 이용한 세포감염시험법

HCT-8 세포를 숙주로 사용하였으며, RPMI 1640 배 지에 10% FBS 및 1 mM Sodium pyruvate, penicillin/ streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 및 일정한 습 도를 유지하면서 2~3일간 배양하였다. monolayer가 형 성되면 Trypsin-EDTA 용액으로 세포를 세포배양 플라 스크 바닥으로부터 떼어낸 뒤 원심분리하여 8개의 well 을 가진 chamber slide system(Lab-Tek chamber slide system 177445)에 적당한 농도가 되도록 각 웰에 세포 를 균일하게 주입한 후 배양하였다. 여기에 적당히 희 석한 크립토스포리디움 난포낭에 sodium hypochlorite solution을 첨가하고 실온에서 20분간 방치한 후 원심분 리하여 상등액을 제거하였으며, 여과멸균한 0.5% Trypsin(pH 2.5)를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한

후 상등액을 제거하고 RPMI 1640 배지에 2%의 여과 멸균된 FBS를 첨가한 세포유지배지를 첨가하여 chamber slide system의 상등액을 제거 후, 각 웰에 감염시켰다. 웰슬라이드 챔버의 배양액을 파스퇴르 피펫으로 제거하고 인산완충용액을 이용, 세척 후 고순도 메탄올 챔버의 각 웰에 약 100 μ L 정도 주입하여 10 분간 고정시켰다. 메탄올을 제거 후, 다시 인산완충용액으로 웰을 세척하였다. 크립토스포리디움 세포분화와 정중에 형성되는 merozoite 및 sporozoite 등에 대한 항체와 형광염색시약이 결합된 형광염색키트(Sporoglox20, A600FLR, waterborne 사)로 1시간 염색한 후, 형광현미경으로 관찰하였다(Slifko *et al.*, 1997).

III. 결과 및 고찰

자연 하천수에서 수온에 따라 크립토스포리디움의 활성 및 감염성의 변화를 보고한 Pokorny 등(2002) 및 Robertson 등(1992)의 연구에서도 알 수 있듯이, 자연 하천수에서 크립토스포리디움 활성 및 감염성에 가장 큰 영향을 주는 인자는 수온이며, 그 외에 영향을 줄 수 있는 인자로는 pH, 탁도 등 유기물에 의한 것일 가능성이 높다. 따라서, 실험기간(2005년 12월~2006년 2월) 동안 수온, pH, 탁도에 대한 수질조사를 한 결과는 Fig. 2와 같다.

수온의 경우, 실험기간동안 4.4~14.0°C의 범위를 나타내었으며, 실험초기 10일간 동안의 수온분포는 9.3~14.0°C로, 대부분 10°C 이상의 수온을 나타내었으며, 이후부터 점차 수온이 낮아지는 경향을 나타내었다. 또한, 하루에 4시간 간격으로 수온을 측정하였을 때, 4시간별 수온의 변화에 있어서도 실험초기에는 시간에 따른 수온 변화의 최대값이 2.5°C에 달할 정도로 변동이 컸으나, 실험이 진행될수록 수온 변화의 변동폭도 점차 낮아졌다.

탁도의 경우 실험기간동안 총 540회의 분석횟수중 5 NTU 이상의 탁도를 나타낸 횟수는 총 3회이었으며, 거

의 대부분 1~4 NTU의 일정한 탁도를 나타내었다.

실험기간 동안의 pH는 7.4~8.5 정도로 큰 변화는 없었다.

수온, pH, 탁도 등 측정된 수질인자 중 탁도는 셀룰로오즈 튜브의 반투막적인 특성상 입자의 크기가 커서 튜브 내부로 들어오지 못하므로 크립토스포리디움의 활성 및 감염성에 미치는 영향이 제한적일 것으로 생각되어 배제하였고 그 외의 환경요인인 수온, pH가 그들의 활성 및 감염성에 미치는 영향을 알아보기로 지속적으로 측정하였다.

수온과 pH에 의한 크립토스포리디움의 활성 및 감염성 변화를 Fig. 3에 나타내었다.

그 결과, 크립토스포리디움의 활성(viability)은 약 30 일 동안은 거의 활성을 잃지 않았으나, 이후 급격하게 활성이 저하되어 42일째 64%, 약 50일째 활성이 약 50%의 활성을 유지하였으며, 89일째 약 8%의 활성을 유지하는 것으로 나타났다.

감염성(infectivity)의 경우는 활성보다 훨씬 더 빨리 소실되었다. 14일 경과까지는 감염성이 거의 그대로 유지되었으나, 20일째 83%, 28일째 68%, 42일째 8%, 49일째 3%로 나타났다. 즉, 크립토스포리디움이 동절기 하천수에 노출되었을 때 감염성이 약 50일 정도 지속되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

이전의 연구결과(Robertson *et al.*, 1992)에서는 하천수 또는 수돗물에 크립토스포리디움을 노출시킨 결과, 거의 176일간 활성이 유지된다고 하였으며, Pokorny 등(2002)은 4°C 및 10°C의 하천수에 14주 동안 크립토스포리디움이 노출된 후에도 감염성이 유지되는 것을 세포감염시험법으로 확인하였다. 반면에, 본 연구에서는 크립토스포리디움의 활성 및 감염성이 각각 90일간, 약 50일간 유지될 뿐이었다. 이와 같은 차이는 온도 조건의 차이에서 기인하는 것으로 추측된다. 즉 Robertson 등(1992) 및 Pokorny 등(2002)은 하천수 및 수돗물 등 자연환경에 크립토스포리디움을 노출하였다 할지라도 실온 내지는 일정한 온도에서 실험을 수행한

Fig. 2. Variations of temperature (a), turbidity (b) and pH (c) during the experimental period (Dec. '05~Feb. '06).

Fig. 3. Variation of viability/infectivity of *Cryptosporidium* sp. depending on changes of temperature and pH during experimental period (Dec. '05~Feb. '06).

반면, 본 연구에서는 그보다 광범위한 4.4~14.0°C의 온도범위에서 실험을 하였으며, 또한 주야간 온도 변화의 폭이 2°C 이상이 되는 조건에서 수행했기 때문에 타 연구자와 다른 연구결과가 도출된 것으로 추측된다.

아울러 수소이온농도(pH)가 크립토스포리디움의 생존에 미치는 영향에 관한 연구는 거의 없다. 다만, 낮은 pH에서보다 중성 및 높은 pH의 미국 토양에서 크립토스포리디움의 개체수가 낮게 나타났다고 보고한 바 있어(Barwick *et al.*, 2003), 실험기간 내내 pH가 7.4~8.5 정도로 중성 및 약간 높은 pH의 환경이 크립토스포리디움의 감염성 및 활성 소실에 기여했을 것으로 생각된다.

수온, pH 외의 환경인자들과 크립토스포리디움의 활성 및 감염성과의 관계에 대한 이전의 연구결과를 보면, Heisz 등(1997)은 하천수에 존재하는 종속영양세균(heterotrophic bacteria)의 농도가 난포낭의 생존에 영향을 끼친다고 하였으며, Chauret 등(1998)은 여과되지 않은 하천수에서보다 막여과된 하천수에서 더 오래 생존한다고 보고하였다.

또 다른 연구결과로는 키틴을 분해하는 효소의 활성이 좋은 세균인 *Serratia marcescens*가 하천에 존재할 경우 이 세균이 크립토스포리디움 난포낭을 분해할 수 있다는 보고도 있으며(Zuckerman *et al.*, 1997), 하천, 호소, 연못 등에 흔히 존재하는 윤충류(Rotifer)가 크립토스포리디움 난포낭을 포식한다는 보고도 있다(Fayer *et al.*, 2000).

세균 또는 윤충류 등이 셀룰로오즈 튜브를 통과하지는 못하지만, 주기적으로 튜브를 교체할 때 하천수가

튜브내로 주입되었으므로 다음 튜브 교체 시기까지 세균이 어느 정도 증식하였을 수도 있었으며, 이 때 하천수에 존재하는 윤충류가 크립토스포리디움의 난포낭을 포식하였을 수도 있다.

이러한 이전의 여러 연구결과들을 종합하면, 실험기간 동안 수온의 변화 폭이 컸었던 점, 중성내지는 약 알칼리성의 pH, 그리고 수환경에 존재하는 종속영양세균과 난포낭을 포식하는 윤충류 등의 복합적 요인이 이전 연구결과와 비교하였을 때, 크립토스포리디움 감염성 및 활성의 지속시간이 짧았던 이유가 아닌가 추측되어졌다.

이 연구결과는 실험실에서 인위적으로 조절한 환경조건이 아닌 자연환경조건에서 오염원으로부터 크립토스포리디움이 하천으로 유입되었을 때, 활성 및 감염성이 어느 기간 정도 지속하는 지를 알 수 있는 계기가 될 것이며, 이전의 연구결과보다 감염성이나 활성에 있어 지속성이 훨씬 떨어지는 것은, 수환경에서의 종속영양세균, pH, 수온의 변동 폭 등 여러 가지 환경요인이 작용한 것으로 판단된다.

IV. 결 론

크립토스포리디움이 하천 등 자연수계 환경에 노출되었을 경우, 감염성 및 활성이 얼마나 오랫동안 지속할 것인지 등을 알아보기 위해 크립토스포리디움 개체수가 높게 나타나는 동절기(2005년 12월~2006년 2월)에 감염성이 있는 크립토스포리디움을 반투막성의 셀룰로오즈 튜브(cellulose tube)에 넣어 자연수계에 노출시킨

후, 수온 및 pH 환경의 변화에 따라 활성 및 감염성의 변화를 조사하였다.

연구결과, 크립토스포리디움이 동절기 수환경 조건인 4.4~14.0°C의 온도와 7.4~8.5의 pH 범위에서 30일까지는 50% 정도가 감염성을 유지하였으며 50일이 경과하면 크립토스포리디움의 감염성이 상실되었으며, 아울러 크립토스포리디움의 활성은 약 90일이 경과하면 초기 활성의 약 8%의 활성을 나타냈다.

참고문헌

1. 환경부, 먹는물수질공정시험방법, 2007.
2. Barwick, R. S., Mohammed, H. O., White, M. E. and Bryant, R. B. : Factors associated with the likelihood of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in soil from dairy farms, *J. Dairy Sci.*, **86**, 784-791, 2003.
3. Campbell, A. T., Robertson, L. J. and Smith, H. V. : Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts : Correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluoregenic vital dyes, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3488-3493, 1992.
4. Carey, C. M., Lee, H. and Trevors, J. T. : Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst, *Water Research*, **38**, 818-862, 2004.
5. Chauret, C., Nolan, K., Chen, P., Springthorpe, S. and Sattar, S. A. : Aging of *Cryptosporidium parvum* oocysts in river water and their susceptibility to disinfection by chlorine and monochloramine, *Can. J. Microbiol.*, **44**, 1154-1160, 1998.
6. Fayer, Ronald, *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*, CRC press, 1997.
7. Fayer, R., Trout, J. M., Walsh, E. and Cole, R. : Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*, *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**, 161-163, 2000.
8. Fayer, R., Trout, J. M. and Nerad, T. : Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *J. Eukaryote. Microbiol.*, **43**, 64S, 1996.
9. Fayer, R. : Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2732-2735, 1994.
10. Heisz, M., Chauret, C., Chen, P., Springthorpe, S. and Sattar, S. A. : In vitro survival of *Cryptosporidium* oocysts in natural waters, In: Fricker, C., Clancy, J. L., Rochelle, P. A., (Eds), Proceedings of the 1997 International Symposium on Waterborne *Cryptosporidium*. American Water Works Association, Denver, CO, pp. 171-175.
11. Mackenzie, W., Neil, M., Hoxie, N., Proctor, M., Gradus, M., Blair, K., Peterson, D., Kazmierczak, J., Adiss, D., Fox, K., Rose, J. and Davis, J. : A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, **331**, 161, 1994.
12. Olson, M. E., Goh, J., Phillips, M., Guselle, N. and McAllister, T.A. : *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocysts survival in water, soil and cattle feces, *J. Environ. Qual.*, **28**, 1991-1996, 1999.
13. Pokorny, N. J., Weir, S. C., Carreno, R. A., Trevors, J. T. and Lee, H. : Influence of temperature on *Cryptosporidium parvum* oocysts infectivity in river water samples as detected by tissue culture assay, *J. Parasitol.*, **88**, 641-643, 2002.
14. Slifko, T. R., Friedman, D. and Rose, J. B. : An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3669-3675, 1997.
15. Robertson, L. J., Campbell, A. T. and Smith, H. V. : Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3494-3500, 1992.
16. Zuckerman, U., Gold, D., Shelef, G., Yuditsky, A. and Arman, R. : Microbial degradation of *Cryptosporidium parvum* by *Serratia marcescens* with high chitolytic activity, In: Fricker, C., Clancy, J. L., Rochelle, P. A., (Eds), Proceedings of the 1997 International Symposium on Waterborne *Cryptosporidium*. American Water Works Association, Denver, CO, pp. 297-304.