

USCG Phase II 선박평형수 성능 평가를 위한 해양 바이러스 생사판별 방법 개발

현봉길, 장풍국, 우주은, 신상아
한국해양과학기술원 선박평형수연구센터
e-mail:bghyun@kiost.ac.kr

Development of marine virus-like particles live/dead determination method for USCG Phase II type approval test

Bonggil Hyun, Pung-Guk Jang, Joo-Eun Woo, Sanga Shin
Ballast Water Research Center, Korea Institute of Ocean Science and Technology

요 약

본 연구는 향후 보다 강화될 것으로 예측되어지는 USCG Phase II 바이러스 분야 형식승인시험을 대비하기 위해 SYBR Green I과 SYBR Gold의 염색 효율을 비교한 후 염색 효율이 높은 시약을 실제 선박평형수 처리장치(electrolysis type, UV + electrolysis type)를 통과한 처리수에 적용해서 다양한 염분(해수, 담수, 기수) 조건에서 USCG Phase II 시험 적용 가능성을 확인해 보고자 하였다. 염색 효율은 시료의 부피가 0.5 mL ~ 2 mL, 염색 시약(Stock solution)을 100배 및 200배 희석한 조건에서 가장 선명하게 관찰되는 것으로 확인되었다. SYBR Green I과 SYBR Gold의 염색효율은 장목한 해수조건의 실험구에서 유의한 차이를 보이지 않았지만, SYBR Gold의 노란색에 비해 SYBR Green I으로 염색한 시료에서 발현하는 녹색 형광이 보다 선명해서 관찰이 용이한 것으로 확인 되었다. 선박평형수 처리장치(electrolysis type, UV + electrolysis type)를 통과하지 않은 실험수 및 대조수에서의 해양 바이러스 현존량은 약 $10^9 \sim 10^{10}$ VLP 100 mL^{-1} 으로 확인된 반면, 처리수에서는 살아 있는 바이러스가 관찰되지 않았다. 실험수 결과를 보면, SYBR Green I은 염분 농도와 무관하게 효과적으로 염색이 되는 것으로 확인되었다. 다양한 선박평형수처리기술에 따른 추가적인 검증 및 염색 방법 개발이 필요하지만, SYBR Green I 염색법은 USCG Phase II 규제 발표 시 해양 바이러스 생사판별에 좋은 대안이 될 수 있을 것으로 판단된다.

1. 서 론

선박평형수를 통해 이동되어지는 생물종은 어패류 유생, 동·식물플랑크톤 및 아주 크기가 작은 박테리아와 바이러스도 포함한다. 바이러스는 해양 생태계에서 가장 많은 개체수를 갖는 생물학적 인자로, 연안에서는 일반적으로 mL 당 $10^7 \sim 10^9$ virus-like particles(VLP)으로 존재하며, 원양으로 갈수록 현존량은 전반적으로 감소하는 경향을 보인다[1]. 따라서 바이러스는 수생환경 어디에서나 존재하는 생물학적 요소이지만, 해양 생물의 사망과 미생물 유전구성의 조절등 해양 생태계 및 인간의 건강에 부정적인 영향을 미칠 수 있다[2].

국제해사기구(IMO: International Maritime Organization)에서는 이와 같이 선박평형수에 포함되어 있는 수서생물이 다른 지역으로 옮겨져 생태계 파괴 및 교란시키는 것을 사전에 방지하기 위해서 선박평

형수관리시스템(BWMS: Ballast Water Management System)을 개발하여 생물을 원천적으로 제거 및 사멸시킨 후 배출해야 하는 국제선박평형수관리협약(IMO D2 regulation)을 제정하였다. 또한 최근 미국 해안경비대(USCG: United States Coast Guard)에서는 자국 해양 생태계 보전을 위해 미국으로 입항하는 선박을 대상으로 선박평형수내 바이러스에 대한 배출수 기준도 새롭게 제정할 계획을 가지고 있다. 하지만 USCG Phase II 잠정 기준에서는 바이러스인 경우 처리수 기준 100 mL 당 $<10^4$ VLP mL^{-1} 로 검출되어야 한다는 기준만 있지 아직까지 어떠한 방법론적 가이드라인도 제시하고 있지 않다.

과거에는 DAPI 염색을 통한 형광현미경 관찰시 바이러스를 직접 계수하기에는 염색 밝기가 충분치 않아서 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope, TEM) 방식이 상대적으로 많이 사용한 반면 [3], 최근에는 SYBR Green I(SGI)과 SYBR Gold(S

G)와 같이 DAPI 보다 강한 형광을 발현시키는 염색방법이 개발되어서 형광현미경을 이용한 방법이 보다 많이 사용되어지고 있다. [4]의 연구에서도 형광현미경을 활용한 염색 방법이 투과전자현미경 방식보다 정확도가 높다고 보고하였다. 두 염색 방법 모두 세포내 DNA와 RNA를 포함하는 핵산(nucleic acid)을 염색하는 방법으로 SGI는 형광 현미경하에서 강한 녹색을 띄고, SG는 노란색을 띤다. 현재까지 SGI를 이용한 선행연구 결과를 보면, 다른 염색법에 비해 간단하고 염색 효율이 높아 많이 사용되고 있지만, 해역의 특성이나 생물량에 따라서 시료와 염색시약의 양을 조금씩 다르게 적용해야 한다고 보고되고 있다[5]. 또한 이러한 염색 방법이 실제 선박평형수처리장치 바이러스 시험방법으로 적합한지를 규명한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 SGI와 SG 염색방법 개발을 위해 먼저 적정 시료 여과 부피 및 염색 시약 농도를 확인한 후 두 염색방법의 염색 효율을 비교한 다음 보다 염색 효율이 좋은 시약을 BWMS(Electrolysis type, UV+Electrolysis type)를 통과한 처리수에 적용해서 다양한 염분(해수, 담수, 기수) 조건하에서 USC G Phase II 시험 적용 가능성을 확인해 보고자 하였다. BWMS를 활용한 실험은 현재의 USCG Phase I 형식 승인 시험 기준에 준해서 실험수를 조성하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 바이러스 실험 방법

2개의 염색(SYBR Green I, SYBR Gold)용액(stock solution)을 이용해서 working solution(50~400배 희석)을 만든 후 시료 당 0.1 mL를 주입하였으며, 염색된 바이러스의 빠른 형광 유실을 방지하기 위해 10%(wt/vol) *p*-phenylenediamine을 1:1 glycerol:PBS 용액을 시료 당 30 μ L 주입하였다. 모든 염색 절차는 Nature Protocol 논문 "Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I"에 명시되어 있는 방법에 준해서 실시하였다[5].

2.2 적정 시료 여과 부피 및 염색 시약 농도

선행 연구에서 연안역 해수 시료인 경우 약 2 mL, 외양수 시료인 경우 5 mL ~ 20 mL을 여과하는 게 적절하다고 하였다[5]. 하지만 바이러스 현존량은 부영양화 정도 및 해역 환경 등에 따라 달라지기 때문에 적정 시료 여과 양 및 염색 시약 농도를 확인하기 위해서 5개의 여과 시료 부피(0.1 mL, 0.2 mL, 0.5 mL, 1.0 mL, 2.0 mL)와 4개의 염색 시약 농도(5

0, 100, 200, 400배 희석)를 설정해서 바이러스 염색 유무 정도 및 계수 가능 여부를 확인했다.

2.3 실제 규모(Full-scale) 검증 실험

한국해양과학기술원 남해연구소 선박평형수처리장치 정부형식승인 육상시험설비를 이용해서 전기분해방법(Electrolysis type)은 2회, UV+전기분해방식(UV+Electrolysis type)은 해수, 기수, 담수 각각 2회 실험을 진행하였다. 각 회차 실험은 500톤 실험수 탱크에서 대조수 탱크와 처리수 탱크로 실험수를 보내는 시작실험(Ballasting)과 대조수 탱크와 처리수 탱크 내 물을 배출하는 종료실험(De-ballasting)으로 나누어서 진행하였다. 시작 실험 시 실험수는 USC G Phase I 기준 준수를 위해 첨가물(Starch, Glucose, Silica) 및 농축된 자연생물종 일정량을 주입하였다. 해양바이러스 시료는 시작 실험 시 실험수, 종료 실험 시 대조수 및 처리수를 실험이 진행되는 동안 연속적으로(continuous) 샘플링 하였다.

3. 결과 및 고찰

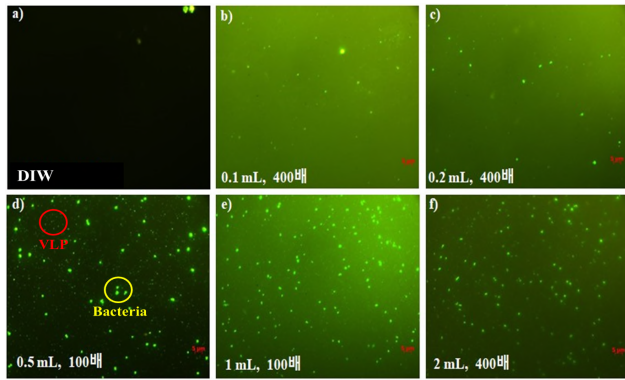
3.1 적정 여과 시료 여과 부피 및 염색 시약 농도

선행연구에서 박테리아나 바이러스 계수 시 SGI 염색 시약을 SG로 대체할 수 있으며, 위 두 시약은 동일한 농도로 사용가능하다고 보고하였다[5]. 그래서 본 연구에서는 SGI 염색 시약에 대해서만 시료 부피에 따른 염색 시약의 농도를 확인한 후 같은 농도로 SG와 염색 효율 비교 실험을 진행하였다. SGI 염색 시 적정한 여과 시료 양 및 염색 시약 농도를 결정하기 위해 표 1과 같은 실험구를 설정한 후 실험을 진행하였다. 시료 0.1 mL ~ 2 mL를 넣고 SGI 시약 농도 구배에 따라 바이러스의 염색 유무를 확인한 결과, SGI stock solution이 100배와 200배 희석된 조건에서는 바이러스 관찰이 용이한 반면[그림 1d, 1e], 400배 희석된 조건에서는 바이러스가 상대적으로 약하게 염색이 되어서 계수하는데 다소 어려움이 있었다[그림 1f]. 시료 0.1 mL과 0.2 mL를 주입하였을 경우 상대적으로 적은 수의 바이러스 개체가 관찰되었는데[그림 1b, 1c], 이는 계수된 개체수가 적어서 결과의 신뢰성을 확보하기 어렵다고 판단되었을 뿐 아니라 생물에 흡수되지 않은 잉여의 염색시약이 배경(Background)을 밝게 해서 바이러스를 계수하기가 어려웠다. 계절에 따른 변화(수온 및 생물량 변화)와 해역마다의 유효한 시료 여과 부피가 다를 것으로 판단되지만, 본 연구 해역인 장목만과 유사한 환경인 경우 바이러스 계수에 용이한 부피는 0.5 mL ~ 2.0 mL이며, SGI 염색시약 농도는 100 ~ 200배 인 것으로 확인되었다[표1].

[표 1] 시료 여과 부피와 염색 시약(SYBR Green I) 농도에 따른 해양 바이러스가 관찰 용이성 표

| Sample volume (mL) | Dilution ratio of SYBR Green I Stock solution | | | |
|--------------------|---|-------|-------|------|
| | × 400 | × 200 | × 100 | × 50 |
| 0.1 | - | - | - | - |
| 0.2 | - | - | - | - |
| 0.5 | + | ++ | ++ | + |
| 1.0 | + | ++ | ++ | + |
| 2.0 | + | ++ | ++ | + |

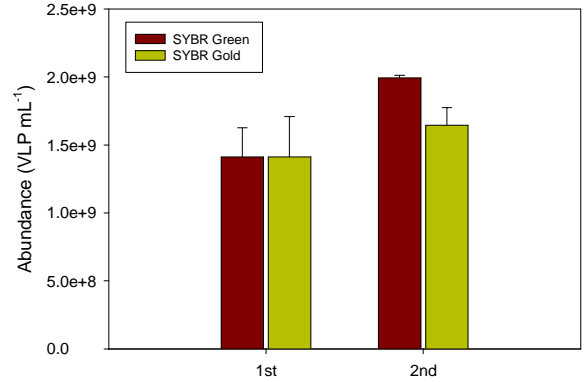
++ Good to observe
 + Observable
 - Unobservable



[그림 1] 시료 여과 부피와 염색 시약(SYBR Green I) 농도에 따른 해양 바이러스 염색 사진

3.2 염색 효율 비교 평가

두 염색방법의 염색 효율 비교 실험은 서로 다른 날짜의 장목만 해수를 이용해서 2차례 진행하였다. 1회 차 실험 시 SGI와 SG에 염색된 해양 바이러스의 평균 개체수는 1.4×10^9 VLP 100 mL^{-1} 으로 동일한 반면, 2회차 실험해서는 SGI가 2.0×10^9 VLP 100 mL^{-1} 으로 1.6×10^9 VLP 100 mL^{-1} 인 SG 보다 다소 높게 나타났다[그림 2]. 이는 SGI로 염색된 바이러스에서 발견되는 녹색 형광이 노란색을 띄는 SG로 염색된 바이러스 비해 관찰하기가 용이했기 때문으로 사료된다. 실제로 몇몇 과학자들은 SG로 염색된 노란색 보다 SGI로 염색된 밝은 녹색을 선호한다고 보고되었다[5]. 하지만 박테리아나 바이러스와 같은 크기가 매우 작은 미생물 계수 시 같은 자릿수 내에서의 변동은 큰 차이로 판단하지 않기 때문에, SGI와 SG의 염색 효율은 비슷한 것으로 판단된다. 선행 연구에서도 두 염색 시약의 염색효율은 유의적으로 차이가 나지 않았다[6]. 염색된 바이러스의 형광 유실 정도는 단독으로 SGI로 염색한 시료는 SG에 비해 형광 유실이 매우 빠른 시간내에 발생하지만, slow-fade diamond antifade mountant를 사용하면 보다 오랜 시간 형광의 유실 없이 안정적으로 사용이 가능했다.

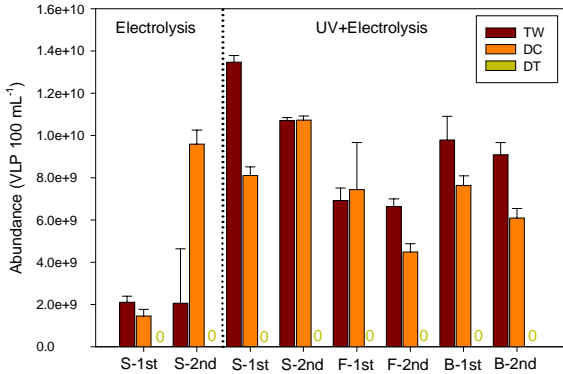


[그림 2] SYBR Green I과 SYBR Gold 염색 효율 비교 결과

3.3 USCG Phase II 형식승인시험 적용 가능성 평가

USCG Phase II 시험에서 바이러스 분석은 배출 시 처리수에서만 진행하며, 배출 가능한 처리수내 바이러스 개체수는 $10,000 \text{ VLP } 100 \text{ mL}^{-1}$ 로 보고되었다. 본 연구에서는 비처리수(실험수, 대조수) 및 B WMS를 통과한 처리수를 이용해서 SGI 염색법이 USCG Phase II 바이러스 시험 방법으로 적용 가능한지 확인해 보았다. 전기분해 방식은 해수에서 2회 진행이 되었으며, 시작 실험 시 실험수내 바이러스의 개체수는 모두 $2.1 \times 10^9 \text{ VLP } 100 \text{ mL}^{-1}$ 이며, 종료 실험 시 대조수에서는 각각 $1.5 \times 10^9 \text{ VLP } 100 \text{ mL}^{-1}$ 과 $9.6 \times 10^9 \text{ VLP } 100 \text{ mL}^{-1}$ 으로 확인되었다[그림 3]. 처리수에서는 염색된 바이러스가 관찰되지 않았다. UV+전기분해방식에서도 실험수는 $6.6 \times 10^9 \text{ VLP } 100 \text{ mL}^{-1} \sim 1.3 \times 10^{10} \text{ VLP } 100 \text{ mL}^{-1}$ 의 범위를 보였고, 종료 실험 시 대조수에서는 $4.5 \times 10^9 \text{ VLP } 100 \text{ mL}^{-1} \sim 1.1 \times 10^{10} \text{ VLP } 100 \text{ mL}^{-1}$ 의 범위를 보였다. 종료 실험 시 처리수에서는 전기분해방식과 마찬가지로 염색된 바이러스가 관찰되지 않았다. 본 연구 결과에서 처리수내에 염색된 바이러스의 개체수가 확인되지 않았지만, 몇몇 처리수 시료에서 염색된 종속 영양박테리아가 관찰되었고, 본 연구 전 소규모 모의실험연구에서도 다양한 생물 사멸 조건(UV, 전기분해 포함)에 노출시킨 처리수내 해양 바이러스가 염색된 결과를 고려하였을 경우, SGI가 BWMS를 통해 생성된 처리수내 바이러스에 염색에 영향을 받지 않을 것으로 판단된다. 따라서 SGI 염색 방법은 바이러스 생사판별에 적용 가능할 것으로 판단되지만, 평형수처리장치의 종류(오존, UV, Heating, NA DCC 등), 처리수내 환경 조건(수온, 염분, pH, 용존 산소, 유기물 농도 등) 및 처리 후 경과 시간 등 여러 가지 인자가 바이러스 생사판별 결과에 영향을

미칠 수 있기 때문에 추가적인 검증 실험이 필요한 것으로 판단된다.



[그림 3] 2가지 타입의 선박평형수처리장치를 이용한 바이러스 제거 효율

4. 결 론

BWMS를 통과한 해양생물에 대한 생사판별은 첫째 염색방법이 간단해서 빠른 시간 내 시료를 처리할 수 있어야 하며, 둘째 염색한 후 일정 시간 동안 염색 효율이 안정적으로 유지되어야 하고, 마지막으로 염색 효율이 높아야 한다. SGI 염색법은 염색이 간단해서 다른 염색 방법(e.g., Yo-Pro)에 비해 상대적으로 시료 전처리 시간이 짧으며, 염색된 바이러스가 발현하는 형광도 안정적(30분 이상)으로 유지 될 뿐만 아니라 크기가 매우 작은 바이러스가 충분히 계수 가능할 정도로 밝은 녹색 형광을 발현하였다. 또한 SGI가 다양한 염분(해수, 기수, 담수) 조건 및 전기분해시 발생하는 화학물질(NaOCl)이 함유된 처리수 조건에서도 염색이 가능한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 현재의 형식승인시험 생물 분석 시간(6시간)을 고려해도 SGI는 USCG Phase II 시험 시 바이러스 생사판별에 좋은 대안이 될 수 있다고 판단된다. 하지만, 현재 잠정 고시된 USCG 바이러스 기준 적용 시 처리수 시료 1 mL을 여과하여 20 filed 관찰하여 계수하였을 때 1개체만 관찰되어도 81,920 VLP 100 mL⁻¹로 배출수 기준을 충족하지 못하게 된다. 이로 인해 여과하는 시료의 양을 증가시키면 여과 시간 증가 및 여과지내 생물이 과다 증첩으로 인한 분석 오차가 발생할 수도 있다. 따라서 USCG Phase II 바이러스 분야 잠정 기준이 보다 완화되어 적용되지 않는 다고 가정할 경우, 시료를 먼저 전처리(Pre-filter)하여 크기가 큰 생물을 제거해서 많은 시료를 여과할 수 있는 방법 등 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

References

- [1] Culley, A. I. and N. A. Welschmeyer, "The abundance, distribution, and correlation of viruses, phytoplankton, and prokaryotes along a Pacific Ocean transect", *Limnol. Oceanogr.*, Vol. 47, No. 5, pp. 1508-1513, 2002.
- [2] 최은석, 이진섭, 김동균, 오정균, 박중범, 정영재, 이택건, "광양만 해양바이러스 개체수와 물리화학적 요인의 계절적 변동. 한국산학기술학회 논문지", Vol. 13, No. 11, pp. 5615-5622, 2012.
- [3] Hara, S., K. Terauchi, and L. Koike, "Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 57, 2731-2734, 1991.
- [4] Leichsenring, J. and J. Lawrence, "Effect of mid-oceanic ballast water exchange on virus-like particle abundance during two trans-Pacific voyages. *Mar. Pollut. Bull.*, Vol. 62, No. 5, pp.1103-1108, 2011.
- [5] Patel, A., R. T. Noble, J. A. Steele, S. S. Michael, I. Hewson, and J. A. Fuhrman, "Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I", *Nature Protocols*, Vol. 2, No. 2, 269-276, 2007.
- [6] Shibata, A., Y. Goto, H. Saito, T. Kikuchi, T. Toda, and S. Taguchi, "Comparison of SYBR Green I and SYBR Gold stains for enumerating bacteria and viruses by epifluorescence microscopy" *Aquatic Microb. Ecol.* Vol. 43, No. 3, pp. 221 - 231, 2006.