

시가 독소 생성 대장균의 제어를 위한 박테리오파지의 분리와 특성 분석

임가연¹ · 박도원¹ · 이영덕² · 박종현^{1,*}
¹가천대학교 식품공학과, ²서원대학교 식품공학과

Isolation and characterization of bacteriophages for the control of Shiga Toxin-producing *E. coli*

Ga-Yeon Lim¹, Do Won Park, Young-Duck Lee², and Jong-Hyun Park^{1,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, College of BioNano Technology, Gachon University

²Department of Food Science and Engineering, Seowon University

Abstract Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an important pathogenic bacterium. To control STEC, the characteristics of the ECP33 and NOECP91 coliphages, which belong to the *Myoviridae* family, were analyzed. The host inhibition range for a total of 44 STEC strains was 45.5% for ECP33 and 65.9% for NOECP91. ECP33 and NOECP91 were relatively stable at 65°C, 50 ppm of sodium hyperchlorite, and a pH value of 4-10. However, the two phages were susceptible to a temperature of 70°C. NOECP91 was killed within 1 h after exposure to 30% ethanol, but ECP33 showed high tolerance even after exposure to 70% ethanol for 1 h. Interestingly, the inhibition of STEC growth according to the multiplicity of infection of 0.1 was confirmed until no growth was observed after 10 hours of culture with the phages. Therefore, the ECP33 and NOECP91 phages may be applied as a biological control agent for Shiga toxin-producing *E. coli*.

Keywords: shiga toxin-producing *E. coli*, coliphage, host spectrum, stability, biocontrol

서 론

시가 독소 생성 대장균(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)은 병원성 대장균의 중요한 한 그룹으로 시가 독소를 분비하는 대장균이다. STEC에 의해 생산된 세포독소는 신장의 배로세포에 독성을 나타내어 배로 독소(Vero toxin)라 부르며, *Shigella dysenteriae*에 의해 생산된 시가 독소(Stx)와 유전적 및 단백질 수준에서 동일하기에 시가 유사 독소(Shiga-like toxin)라고도 불린다(Nataro과 Kaper, 1998; Nakao 등, 2002). 다른 식중독 균과 달리 100-200개의 적은 균수로도 감염이 가능하며, 감염시 출혈성 대장염을 일으키고 심한 경우 용혈성 요독 증후군(hemolytic-uremic syndrome, HUS)의 심각한 합병증이 나타난다(Kim 등, 2009). Majowicz 등(2014)은 STEC로 인해 전 세계적으로 매년 2,801,000건의 급성 질환이 유발되어 HUS가 3890건, 사망 230건으로 추정하고 있다. STEC는 최소 100여종 이상의 대장균 혈청형을 갖는다. 이 중 가장 많이 알려진 것은 O157:H7 균으로 1982년에 미국에서 덜 익은 햄버거로 인하여 집단으로 혈청설사를 보이는 환자들에게서 처음으로 분리되었으며, STEC 혈청형중 병원성이 가장 강력한 것으로 알려져 있다(Brooks 등, 2005; Law,

2000; Majowicz 등, 2014; Smith 등, 2014). 근래에는 O157균주보다 병원성은 약하지만, non-O157 STEC에 의한 발병률이 높아지고 있다(Brooks, 2005; Gould, 2013). 특히 non-O157 STEC 중 serotype O26, O45, O103, O111, O121, O145는 전 세계적으로 매년 36,000건, 1,000명 병원치료, 30명 사망을 일으키는 “Big six” non-O157 STEC에 해당하며, 2011년 독일에서 크게 발병하여 이슈화 되었던 O104:H4 STEC의 경우 주변 국가들에서도 동시 다발적으로 발생하여 약 4,000 여명의 환자가 발생하여 이 중 900 여명이 HUS으로 진행되어 54명의 사망자가 발생하였다(Flank 등, 2011; Kaper 등, 2004; Karch 등, 2012; Mathusa 등, 2010). 이처럼 STEC는 감염력이 높고 집단 식품중독을 일으킬 위험이 크기에 식품과 식품제조환경에서 오염이 되지 않도록 제어할 필요성이 있다.

박테리오파지는 세균을 숙주로 하는 세균성 바이러스의 일종으로, 1915년 Twort와 1917년 d’Herelle가 각각 독립적으로 박테리오파지를 발견하였다(Sulakvelidze 등, 2001). 박테리오파지는 세균을 숙주로 삼기 때문에 세균이 많이 존재하는 곳에 있어 오수, 토양, 분변 등 다양한 환경에서 발견된다. 또한, 특정 세균에만 선택적으로 침입하여 증식 후 용균을 일으키는 숙주특이성을 갖는다. 이러한 박테리오파지의 여러 특성을 활용하여 다양한 연구 분야에 적용이 가능하다(Marks과 Sharp, 2000). Phage therapy는 파지의 숙주특이성을 이용하여 특정한 병을 치료하는 분야로, 1940년대에 항생제의 대두로 관심도가 떨어졌으나 항생제 내성균의 출현으로 항생제 대체 물질로서 다시 활발한 연구가 진행되고 있다(Brissow, 2005; Oliveira 등, 2009). 이 외에도 박테리오파지 유전자를 이용한 용균 효소 등의 유용 효소의 생산, 병원성 세균의 검출 및 제어, 특정 단백질 또는 항체를 만들어내는

*Corresponding author: Jong-Hyun Park, Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam, Gyeonggi 13120, Korea
Tel: +82-31-750-5523
Fax: +82-31-750-5273
E-mail: p5062@gachon.ac.kr
Received August 28, 2018; revised October 10, 2018; accepted October 29, 2018

파지 표출(phage display), 병원성 미생물의 분류(typing), 백신관련 연구, 유제품에 있어서 젖산세균의 파지 저항 균주 개발, 환경오염 지표, 파지 유전자의 전이, 파지의 숙주특이성과 밀접한 관계를 갖는 수용체연구 등 매우 광범위하게 연구가 되고 있다 (Guglielmotti 등, 2011; Khakhria 등, 1990; Lienemann 등, 2015; Tzipilevich 등, 2017).

최근의 식품시장은 소비자들의 건강에 대한 관심 증대와 1인 가구 증가 등으로 인해 신선 농식품과 연관된 최소가공식품 및 유기농산물 시장의 소비가 늘어나고 있다. 이러한 신선 농산물의 경우 다른 식품군에 비해 병원성 미생물에 더욱 취약한 편이며, 이에 안전성 문제가 중요하게 인식되고 있다. 그러나 신선 농식품의 경우 가열 등의 물리적 살균처리에 의해 식품의 품질이 저하되기 쉬우며, 화학적 살균처리의 경우 인체에 대한 안전성 문제 등으로 소비자들이 화학적 살균제를 사용하는 것에 대해 거부감을 느끼는 경향이 크다. 아울러 식품에 오염되어 있는 세균이 바이오필름(biofilm)을 형성하게 되면 세포밖 중합물질(extracellular polymeric substances, EPS)을 분비하여 외부환경에 대해 보호가 되기 때문에, 일반적인 열처리나 물리적인 방법 및 화학적 살균소독제를 사용한다 하여도 그 효과가 크지 않다. 이에 더욱 더 천연/자연 항균제나 박테리오파지, 용균효소인 endolysin 등이 제안되고 있는 상황이다(Sass과 Bierbaum, 2007). 그 중에서도 박테리오파지의 숙주특이성을 이용하여 병원성 세균을 제어하는 위생 처리제 개발 분야는 다른 정상세균총이나 사람에게는 영향을 미치지 않고, 저산화 효과가 확인되고 있기에 식품 분야에서의 적용 범위가 점차 확대되고 있다. 다만, 위생처리제로서의 박테리오파지 선별에 있어 숙주특이성이 강하여 숙주저해범위가 좁거나 지속적으로 처리 시 병원성 세균에 면역이 생겨 다시 생육을 하게 될 수가 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 특성이 다른 박테리오파지들을 혼합 처리하거나, 다른 위생처리제들과 복합처리를 시도해볼 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 국내 하천수로부터 STEC를 표적으로 하는 박테리오파지를 분리하여 숙주저해범위와 여러 환경에 대한 안정성 등의 기본 특성을 분석하고, 서로 특성이 다른 파지의 STEC 생육제어정도를 확인함으로써 선별한 파지의 생물학적 위생처리제 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

박테리오파지 분리를 위한 균주 배양

STEC 대상의 박테리오파지를 분리하기 위해 *E. coli* O157:H7 균주에 속하는 *E. coli* NCCP 13930, *E. coli* NCTC 12079, *E. coli* O157:H7 505B 3주와 non-O157 STEC 균주에 속하는 *E. coli* NCCP 13979 (O104), *E. coli* NCCP 13934 (O179), *E. coli* NCCP 13937 (O103) 3주를 숙주균주로 사용하였다. 이 균주들은 EMB agar (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)에 희석 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 이후 단일 집락을 위해 10 mM의 염화칼슘이 첨가된 Luria Bertani broth (LBC, Difco Laboratory, Detroit, MI, USA) 5 mL에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다.

박테리오파지 분리

전국 각지의 하천수 시료를 채수하여 대장균 박테리오파지를 분리하는데 사용하였다. 시료와 LBC broth (10 mM CaCl₂ 첨가)를 1:9 비율로 섞어 균질화하고, LBC broth에서 전 배양된 약 8-9 log CFU/mL 수준의 숙주균주를 각각 100 µL씩 접종한 후 37°C, 150 rpm으로 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 8000 rpm

에서 10분간 원심분리하고 상등액/상층액을 0.22 µm 시린지 거르개(syringe filter, Millipore, MA, USA)를 이용해 제거 하였다. 제거 처리한 용액은 10진 희석하여 각 숙주균주 별로 LBC agar에 plaque assay를 수행하고 37°C에서 24시간 배양하여 plaque 형성을 확인하였다. 생성된 plaque는 형태학적인 특성에 따라 single plaque로 순수 분리하고, 각각 10% glycerol stock하여 -70°C에서 보관하였다.

숙주저해특성

분리된 대장균파지(coliphage)를 대상으로 하여 18주의 *E. coli* O157 균주와 26주의 non-O157 STEC 균주에 대해 숙주저해범위를 spot assay를 수행하여 확인하였다. LBC broth에서 계대 배양된 44주의 *E. coli* STEC 균주를 LBC soft agar (0.15% agar 포함)에 분주하고 LBC agar에 중첩한 후, 분리된 대장균파지 용액을 10 µL씩 분주하고 37°C에서 24시간 배양하여 plaque 형성을 확인하였다.

형태학적 특성

형태학적 특성을 분석하기 위하여 다량의 파지 용액을 2 M NaCl이 첨가된 20% 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG) 8000 (Sigma)을 이용하여 약 9-10 log PFU/mL 수준으로 농축하였다(Lee와 Park, 2014). 농축된 파지용액을 25,000 g, 4°C, 1시간 조건으로 원심분리하여 상층액을 제거한 후 0.1 M 아세트산암모늄(ammonium acetate) 용액을 이용하여 수세하는 과정을 2회 반복하고 최종적으로 1×SM buffer (10 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 0.01% gelatin, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 현탁하여 파지정제과정을 거쳤다. 정제된 파지용액을 2% 아세트산우라닐(uranyl acetate)을 이용하여 negative stain을 수행하고, 80 kV 하에서 투과 전자현미경(Transmission electron microscope, TEM)을 통해 형태학적 특성을 확인하였다.

다양한 환경에서의 안정성 분석

분리한 coliphage를 고온, pH, 유기용매(에탄올) 및 차아염소산(NaClO)의 다양한 조건에 노출시켜 극한 환경에 대한 생육 안정성을 분석하였다. 고온 환경에 대해서는 65, 70°C, pH는 염산과 수산화소듐을 사용하여 pH 4, pH 7, pH 10, 유기용매로는 99.9% 에탄올(EtOH)을 사용하여 30, 50, 70%의 에탄올에 노출시키고, 차아염소산의 경우 최종 50, 100 ppm 농도의 차아염소산 환경에 노출시켰다. 각각의 조건별로 처리한 파지용액은 바로 희석하여 LBC agar에 spot assay를 수행하였으며, 처리를 하지 않은 대조군과 함께 37°C에서 24시간 배양한 후, 생성된 plaque를 계수하여 파지의 감소량을 확인함으로써 각 환경에 대한 파지의 안정성을 분석하였다. 각 실험은 3회 반복하여 평균으로 나타내었다.

파지 처리량에 따른 Shiga toxin-producing *E. coli* 시가독소 생성 대장균 생육억제

선별 대장균파지에 의한 STEC의 생육억제를 알아보기 위해 96-well count plate에 200 µL의 LBC broth를 담은 후, 각각 대수증식까지 배양한 *E. coli* O157:H7 NCCP 13930 균주와 *E. coli* O103 NCCP 13937 균주를 개별로 접종하였다. 여기에 ECP33 파지와 NOECP91 파지를 각각 0.1과 0.0001 수준의 감염다중도(Multiplicity of infection, MOI)가 되도록 접종한 후 37°C의 배양기에 150 rpm으로 교반 배양하면서, 매 시간마다 자외선 분광광도계를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하여 표적 균주에 대한 생육 억제 정도를 분석하였다.

결과 및 고찰

박테리오파지의 분리와 숙주저해특성

하천수 시료로부터 *E. coli* STEC 균주를 숙주균주로 사용하여 총 52주의 *E. coli* 파지를 분리하였다. 분리된 파지는 *E. coli* O157:H7 숙주 균으로부터 분리된 경우 ECP (*E. coli* phage), non-O157 STEC 숙주 균으로부터 분리된 경우 NOECP (non-O157 *E. coli* phage)라 명명하였다. 44주의 STEC 균주를 대상으로 숙주저해특성을 분석하여 52주의 대장균파지 중 숙주저해범위가 넓은 ECP33 파지와 NOECP91 파지를 선별하였다(Table 1).

ECP33 파지와 NOECP91 파지는 26주의 *E. coli* O157:H7 균주에 대해서 50% 이상의 숙주저해특성을 가졌으며, 주요 발병 non-O157 STEC serotype (O26, O45, O103, O111, O121, O145 및 O104)에 해당하는 11균주에 대해서도 ECP33 파지는 81.8%, NOECP91 파지는 90.9%의 넓은 숙주저해특성을 가지는 것으로 나타났다. 또한, 두 파지를 혼용할 경우, 주요 발병 non-O157 STEC serotype 11균주를 모두 감염시킬 수 있을 것으로 기대되었다. 이와 관련하여 Kim 등(2016a)은 *E. coli* O157:H7 특이적 파지그룹은 다른 혈청형과 비병원성 대장균에는 전혀 감염되지 않은 것과 대조적으로 광범위 특이성의 파지그룹은 경우 O55, O91, O103, O111, O117 및 O179 혈청형의 10주에 대해 50% 이상의 감염률을 보이면서 O157:H7에는 25-95%의 광범위한 감염률을 보인다고 보고하였다. 반면, Raya 등(2006)은 CEV1이 17 균주의 *E. coli* O157:H7 뿐만 아니라 O43 및 O126을 포함한 다른 혈청형에도 감염된다는 유사한 결과를 보고하였다.

그러므로 본 연구에서 분리된 ECP33 파지와 NOECP91 파지는 비교적 O157을 포함 STEC 균주에 대한 숙주저해특성이 넓기 때문에 STEC 균주의 생물학적 제어제로서의 적용이 가능할 것으로 사료된다.

형태적 특성

ECP33 파지와 NOECP91 파지의 투과 전자 현미경(TEM)을 통해 형태학적 특성을 확인한 결과 모두 *Myoviridae* family에 속하

였다(Fig. 1).

ECP33은 머리의 가로, 세로 길이는 약 77.5 nm, 꼬리 길이가 약 115 nm이었으며, NOECP91은 머리의 가로, 세로 길이는 약 77 nm, 꼬리 길이가 약 95.5 nm인 것으로 나타났다. 자연계에 존재하고 있는 박테리오파지들 중 약 95% 이상은 선형 이중나선 DNA와 꼬리를 가진 Caudovirales목에 속하며, *Siphoviridae* > *Myoviridae* > *Podoviridae* 순으로 많이 존재한다고 한다(Hendrix, 2003). 특히, *Myoviridae* family에 속하는 박테리오파지는 수축성 꼬리를 갖는 것이 특징이다(Ackermann, 2003). 선행연구들을 보면, 대장균 파지는 경우에 따라 *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* family가 모두 나타나는 것을 알 수 있다(Dini와 Urraza, 2010; Kim 등, 2016b; Lee와 Park, 2015). Kim 등(2016b)의 연구에서는 O157:H7에 특이적인 파지그룹은 *Siphoviridae*, 숙주광범위 특이성의 파지그룹은 *Myoviridae* family에 속하였다. Brüßow (2005)에 따르면 시험관 내에서 O157 균주는 *Myoviridae*보다 *Siphoviridae*에 대해 100배 높은 파지 내성을 가진다고 보고하였다. Dini와 Urraza(2010)가 분리한 대장균파지는 *Podoviridae*와 *Myoviridae* family로 나누어지며, 특히 non-O157:H7을 숙주균주로 사용하여 분리된 대장균파지는 모두 *Myoviridae* family로 나타났다고 보고하였다. 이러한 연구결과들을 보았을 때, 자연 환경에 있는 O157:H7을 숙주로 하는 박테리오파지는 *Siphoviridae* family인 경우가 더 많아 O157 균주가 *Siphoviridae*에 대한 파지 내성이 강한 것으로 사료된다. 그렇기에 추후 박테리오파지를 활용하여 STEC 균을 제어하고자 할 때, 다른 특성이 비슷하다면 형태학적으로 *Siphoviridae*보다는 *Myoviridae* family에 속하는 파지를 선별하는 것이 더 효율적일 것으로 보인다.

다양한 환경에서의 파지 안정성 분석

ECP33 파지와 NOECP91 파지에 대해 65°C와 70°C에서의 열 안정성을 확인한 결과, 65°C에서는 ECP33 파지의 경우 30분 반응까지도 초기농도가 변함없이 유지하였고, NOECP91 파지도 초기 약 9 log PFU/mL에서 약 3 log 정도 감소한 6 log PFU/mL가 생존하였다(Fig. 2A). 반면 70°C에서는 Fig. 2B와 같이 NOECP91

Table 1. Host spectrum of ECP33 and NOECP91 isolated for shiga-toxin producing *E. coli*

Bacteriophage	O157:H7	Non-O157 STEC								Total
		O26	O45	O103	O111	O121	O145	O104	Others	
ECP33	10 ¹ /18 ²⁾	1/1	0/1	2/2	2/2	1/1	0/1	3/3	1/15	20/44
NOECP91	10/18	1/1	1/1	2/2	1/2	1/1	1/1	3/3	9/15	29/44

¹⁾Number of infected strains, ²⁾Number of tested strains

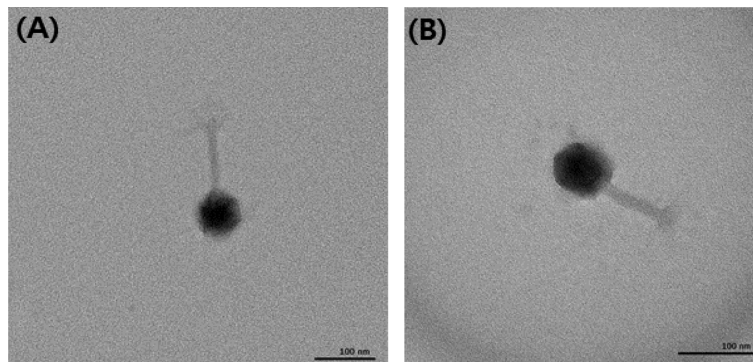


Fig. 1. Transmission Electron Microscopy micrographs of (A) ECP33 and (B) NOECP91. These phages have similar morphology and are classified at the *Myoviridae* family (scale bar: 100 nm).

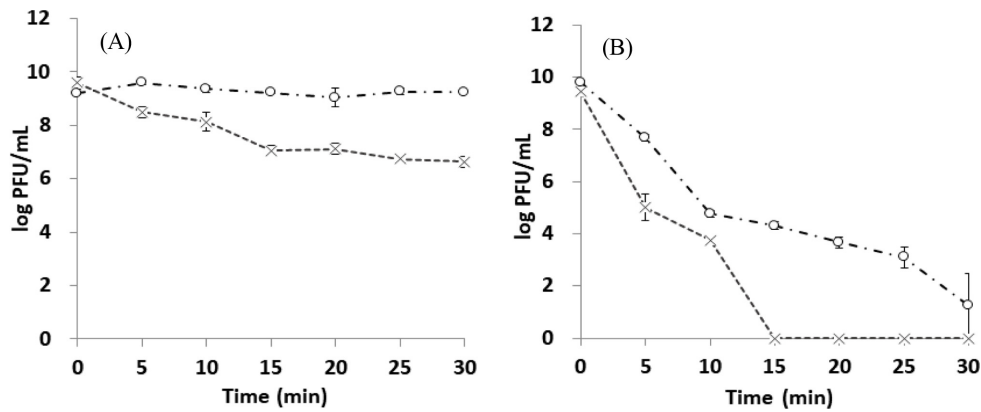


Fig. 2. Stability of ECP33 and NOECP91 at (A) 65 and (B) 70°C. The values are means ± standard deviation of the three replicates. Symbols: ○, ECP33; ×, NOECP91

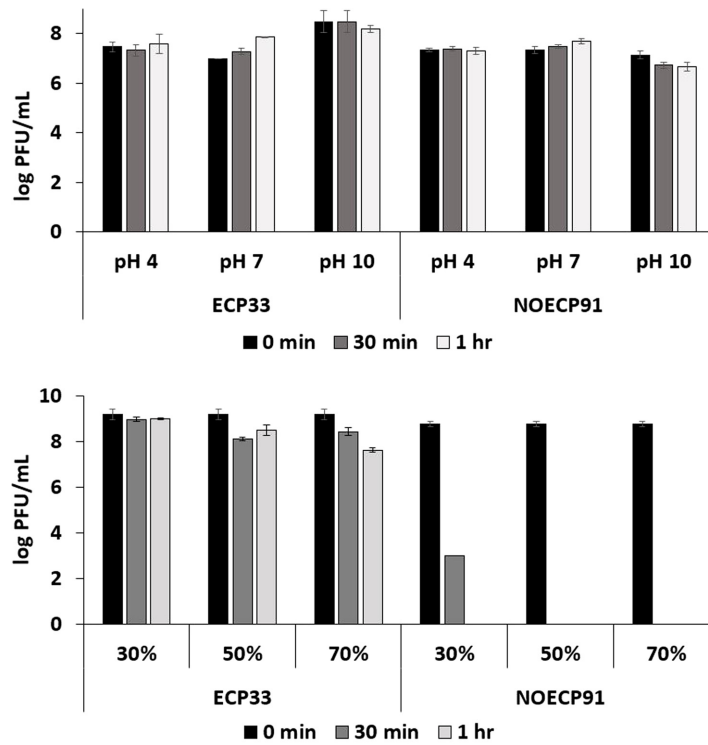


Fig. 3. Stability of ECP33 and NOECP91 under various pH (A) and ethanol (B) conditions for 30 min and 1 h. The values are means ± standard deviation of the three replicates.

파지는 15분 안에 모두 사멸하였으며, ECP33 파지의 경우 노출 후 10분 내에 급격히 4 log PFU/mL로 감소하고 이후 꾸준히 감소하여 30분에는 대부분의 파지가 사멸하였다. Lee 등(2013)의 연구에서도 이와 유사하게 *E. coli* phage인 ECP4가 65°C에서는 저항성을 보여주었으나, 70°C에서는 20분 만에 완전히 사멸하였다고 보고하였다. 반면, 젖산균 파지의 경우 Buzrul 등(2007)의 연구에서 72°C에서 15분간 열처리를 하여도 완전히 사멸되지 않을 수 있음을 언급하였고, Guglielmotti 등(2011)에 따르면 일부 박테리오파지는 90°C 이상의 온도에서도 저항성을 가지는 경우가 있다고 보고하였다. 또한, 극한미생물(extremophile)을 숙주로 삼는 박테리오파지의 경우, 숙주가 사는 환경에 따라 높은 내열성을 지닌다는 연구결과도 있다(Minakhin 등, 2008).

다양한 pH와 유기용매(EtOH) 처리에 대한 안정성

선별된 3주의 *E. coli* phage를 pH 4, pH 7, pH 10으로 맞춘 1×SM buffer에 각각 30분과 1시간 동안 노출시킨 결과, ECP33 파지와 NOECP91 파지 모두 대조군과 비교하여 1시간 처리 시까지도 오차범위 내에서 0.5 log PFU/mL 미만의 감소율을 보여 산성인 pH 4에서 강염기인 pH 10에 이르는 다양한 환경에서 비교적 안정적임을 알 수 있었다(Fig. 3A). pH 환경에 있어 강산성 조건에서는 박테리오파지의 단백질이 서로 응집되는 것이 원인이 되어 알칼리 조건보다는 산성 조건에서 더 불안정한 것으로 알려져 있으며, pH 2에서는 대부분 불활성화 되는 것으로 보고되고 있다(Joczyk 등, 2011). EtOH 처리의 경우 선별 *E. coli* phage를 30, 50, 70% 에탄올에 각각 30분, 1시간 동안 노출시킨

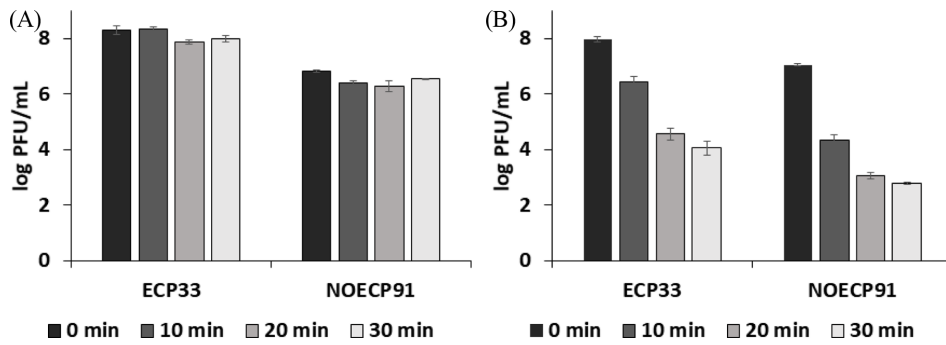


Fig. 4. Stability of ECP33 and NOECP91 at (A) 50 ppm of NaClO and (B) 100 ppm of NaClO. The values are means \pm standard deviation of the three replicates.

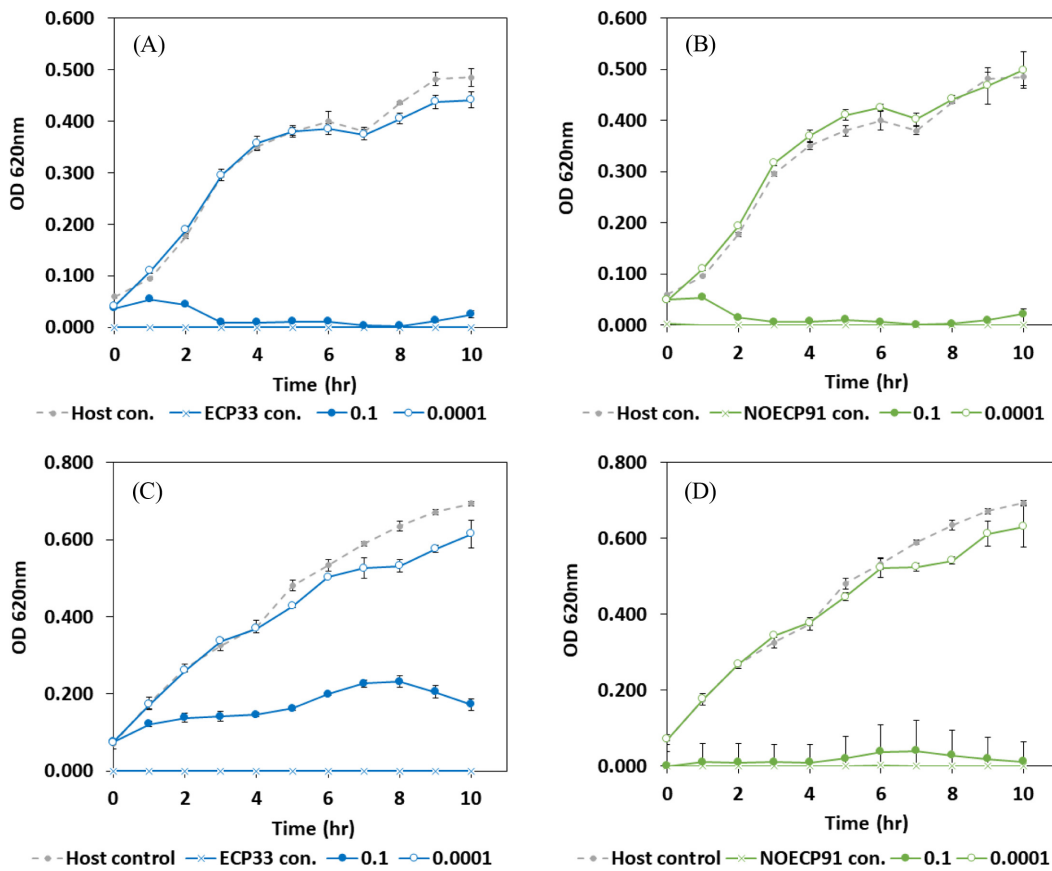


Fig. 5. Growth inhibition using bacteriophage for *E. coli* NCCP 13930 (O157:H7) and *E. coli* NCCP 13937 (O103). (A) *E. coli* NCCP 13930/ECP33, (B) *E. coli* NCCP 13930/NOECP91, (C) *E. coli* NCCP 13937/ECP33, (D) *E. coli* NCCP 13937/NOECP91, Symbols: 0.1, MOI 0.1; 0.0001, MOI 0.0001. The values are means \pm standard deviation of the three replicates.

결과, 두 박테리오파지가 다소 다른 양상을 보였다(Fig. 3B). ECP33의 경우 저농도의 에탄올 처리에는 물론이고 고농도의 70% 에탄올에서 1시간 처리 시에도 약 1.5 log의 감소를 보여 에탄올 환경에 대해 안정적임을 알 수 있었다. 이와 대조적으로 NOECP91의 경우 30%의 에탄올에 30분만 처리하여도 초기 약 8.7 log PFU/mL의 농도에서 약 3 log PFU/mL까지 감소하고 1시간 처리 시와 이보다 높은 농도의 에탄올에서 모두 사멸하여 에탄올 환경에 매우 취약함을 알 수 있었다. Kim 등(2016a)은 *E. coli* O157에서 분리된 대장균파지가 host spectrum이 넓은 대장균파지에 비해 다양한 농도의 에탄올 처리에 비교적 안정적이라고 보고하였는데, 이는 본 연구에서 *E. coli* O157:H7 균주로부터 분리된 ECP33과 non-O157 균주로부터 분리되어 숙주범위가 비교적

가장 넓은 NOECP91 사이에 에탄올 안정성이 차이가 있는 점과 유사한 연구결과이다.

차아염소산(NaClO) 처리에 대한 안정성

식품에서 대표적인 살균소독제로 이용되는 차아염소산은 일반적으로 바이러스에 대해 200 ppm의 농도로 처리하도록 권장되고 있다. Sanekata 등(2010)은 FCV (a surrogate for norovirus)와 IFV (human influenza virus)의 경우 100 ppm의 차아염소산 용액을 15초만 처리하여도 약 90%에 가까이 감소한다고 보고하였다. 이에 선별 *E. coli* 파지를 50 ppm과 100 ppm의 NaClO 환경에 노출시킨 결과, 50 ppm 환경에서는 30분까지 방치하여도 3주의 파지 모두 0.5 log PFU/mL 미만의 감소율을 보여 비교적 안정적이었

다. 반면에 100 ppm 농도에서는 초기 7.0-8.0 log PFU/mL의 파지용액을 30분 처리 시 ECP33 파지와 NOECP91 파지가 각각 3.9-4.2 log정도 감소하여 99.99% 가까이 사멸되는 것을 확인하였다(Fig. 4).

Coliphage/대장균파지 처리에 따른 Shiga toxin-producing *E. coli* 시가독소 생성 대장균 생육억제

96-well count plate 상에서 ECP33 파지와 NOECP91 파지에 의한 STEC 균주의 생육억제를 10시간 동안 알아본 결과는 Fig. 5와 같다. 2주의 STEC 균주를 대상으로 MOI 0.1과 0.0001의 두 가지 MOI 조건으로 실험하였으나, MOI 0.0001의 경우에는 ECP33 파지와 NOECP91 파지 모두 *E. coli* 대조군 대비 유사하거나 20% 미만의 낮은 감소율을 보여 생육제어가 되지 않았다. MOI 0.1 수준에서 ECP33은 O157:H7 균주인 *E. coli* NCCP 13930에 대해서 10시간 배양 시까지 0에 가까운 수치를 보이며, 이때의 감소율이 약 94.9%인 것으로 나타났다. 이에 대조적으로 non-O157 균주인 *E. coli* NCCP 13937의 경우에는 숙주 균 대비 생육제어가 되긴 하나, 초기에 접종한 균수 수준으로 유지되거나 약하게 생육하여, 10시간 배양 시 각각의 균에 대해 약 75.2%의 감소율을 보였다. NOECP91의 경우, MOI 0.1 수준에서 *E. coli* NCCP 13930과 *E. coli* NCCP 13937 균주에 대해서는 10시간 배양 시까지 흡광도 값이 0에 가까운 수치를 보여 이때의 감소율이 각각 약 95.8%와 98.4%로 ECP33 파지에 비해 더 효과적으로 생육제어가 되는 것을 확인하였다. 이와 유사한 연구결과로, Kim(2013)의 연구결과에서 분리한 대장균파지들을 MOI 0.1 수준으로 처리 시 배양 7시간 까지 파지별로 70-97.6%의 감소율을 보였으며, 박테리오파지를 50 ppm의 차아염소산 및 30% 에탄올, 0.1% 젯산 용액의 위생처리제들과 복합처리 시, 파지 용액을 제외한 다른 위생처리제만으로 복합처리한 경우에 비해 30% 이상의 감소율을 보였다고 한다. Santos 등(2010)의 결과에서는 분리한 박테리오파지들이 MOI의 농도에 비례하여 *E. coli*의 감소율이 높아지는 것으로 보아 MOI에 의존적임을 알 수 있다. 아울러 많은 연구결과에서 박테리오파지를 개별 처리하는 경우보다 혼합처리를 할 경우 더 장시간동안 강하게 제어된다고 보고되고 있다(Dini와 Urraza, 2010; Kim, 2013; O'Flynn 등, 2004). 그러므로 본 연구에서 분리된 ECP33 파지와 NOECP91 파지는 STEC의 생육제어를 위한 생물학적 위생처리제로서 활용할 수 있을 것이며, 환경에 대한 안정성 특성이 다소 다르기에 phage cocktail 처리를 하거나, 다른 위생처리제들과 함께 적용할 경우 더 다양한 식품 환경에서 장시간 동안 STEC를 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 시가독소 생성 대장균(STEC)를 제어하기 위하여 하천수 시료로부터 넓은 숙주저해범위를 갖는 ECP33 파지와 NOECP91 파지를 분리, 선별하였다. 총 44주의 STEC균주에 대해 ECP33 파지는 약 45.5%와 NOECP91 파지는 약 65.9%로 숙주저해특성을 가지는 것으로 나타났다. 형태학적 특성을 확인한 결과 모두 *Myoviridae* family에 속하였다. 환경에 대한 안정성 분석을 진행한 결과, 두 파지 모두 50 ppm 농도의 차아염소산 및 pH 4-10의 pH환경에 대해서는 최소 30분까지 비교적 안정한 것으로 나타났다. 반면, 70°C의 고온에서는 NOECP91 파지는 15분 내에, ECP33 파지는 30분 처리 시에 대부분 사멸하고, 유기용매(EtOH) 환경에서 NOECP91 파지는 30% 에탄올 1시간 처리에 모

두 사멸하였으나, ECP33파지의 경우 70% EtOH/에탄올 1시간 처리에도 2 log PFU/mL 미만의 감소율을 보여 온도와 유기용매(EtOH) 환경에 대해 ECP33 파지가 NOECP91 파지보다 안정적인 것으로 나타났다. 아울러 분리된 ECP33 파지와 NOECP91 파지를 MOI 0.1 조건에 따른 STEC 균주 생육억제 정도를 분석한 결과, 배양 10시간대까지 생육억제가 이루어지는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구를 통해 분리된 ECP33 파지와 NOECP91 파지는 시가독소 생성 대장균의 생물학적 제어제로서 적용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 농림식품기술기획평가원의 연구개발비(117060-03-2-HD020)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* 154: 245-251 (2003)
- Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J. Infect. Dis.* 192: 1422-1429 (2005)
- Brüssow H. Phage therapy: The *Escherichia coli* experience. *Microbiol.* 151: 2133-2140 (2005)
- Buzrul S, Öztürk P, Alpas H, Akcelik M. Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages. *LWT-Food Sci. Technol.* 40: 1671-1677 (2007)
- Dini C, Urraza PJ. Isolation and selection of coliphages as potential biocontrol agents of enterohemorrhagic and shiga toxin-producing *E. coli* (EHEC and ETEC) in cattle. *J. Appl. Microbiol.* 109: 873-887 (2010)
- Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M. Epidemic profile of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 outbreak in Germany. *New Eng. J. Med.* 365: 1771-1780 (2011)
- Gould LH, Mody RK, Ong KL, Clogher P, Cronquist AB, Garman KN, Lathrop S, Medus C, Spina NL, Webb TH, White PL. Increased recognition of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: Epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog. Dis.* 10: 453-460 (2013)
- Guglielmotti DM, Mercanti DJ, Reinheimer JA, Quiberoni Adel L. Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front. Microbiol.* 2: 282 (2011)
- Hendrix RW. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 506-511 (2003)
- Joczyk E, Kak M, Mzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages. *Folia Microbiol.* 56: 191-200 (2011)
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 123-140 (2004)
- Karch H, Denamur E, Dobrindt U, Finlay BB, Hengge R, Johannes L, Ron EZ, Tønjum T, Sansonetti PJ, Vicente M. The enemy within us: Lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104: H4 outbreak. *EMBO Mol. Med.* 4: 841-848 (2012)
- Khakhria R, Duck D, Lior H. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157: H7. *Epidemiol. Infect.* 105: 511-520 (1990)
- Kim JY. Characterization of bacteriophage for enterohemorrhagic *E. coli* and application as sanitizer. MS thesis, Gachon University, Sungnam, Korea (2013)
- Kim EJ, Chang HJ, Kwak SJ, Park JH. Virulence factors and stability of coliphages specific to *Escherichia coli* O157:H7 and to various *E. coli* infection. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 2060-2065 (2016a)
- Kim MJ, Kim SH, Kim TS, Kee HY, Seo JJ, Kim ES, Park JT,

- Chung JK, Lee J. Identification of shiga toxin-producing *E. coli* isolated from diarrhea patients and cattle in Gwangju area, Korea. *J. Bacteriol. Virol.* 39: 29-39 (2009)
- Kim EJ, Lee H, Lee JH, Ryu S, Park JH. Morphological features and lipopolysaccharide attachment of coliphages specific to *Escherichia coli* O157: H7 and to a broad range of *E. coli* hosts. *Appl. Biol. Chem.* 59: 109-116 (2016b)
- Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.* 88: 729-745 (2000)
- Lee YD, Kim JY, Park JH. Characteristics of coliphage ECP4 and potential use as a sanitizing agent for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control* 34: 255-260 (2013)
- Lee YD, Park JH. Isolation and characterization of temperate phages in *Enterococcus faecium* from Sprouts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 323-327 (2014)
- Lee YD, Park JH. Characterization and application of phages isolated from sewage for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm. *LWT-Food Sci. Technol.* 60: 571-577 (2015)
- Lienemann T, Kyyhkynen A, Halkilähti J, Haukka K, Siitonen A. Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA. *BMC Microbiol.* 15: 131 (2015)
- Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A, Sargeant JM, Stapleton J, Angulo FJ, Yeung DH, Kirk MD. Global incidence of human shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog. Dis.* 11: 447-455 (2014)
- Marks T, Sharp R. Bacteriophages and biotechnology: A review. *J. Chem. Tech. Biot.* 75: 6-17 (2000)
- Mathusa EC, Chen Y, Enache E, Hontz L. Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *J. Food Protect.* 73: 1721-1736 (2010)
- Minakhin L, Goel M, Berdygulova Z, Ramanculov E, Florens L, Glazko G, Karamychev VN, Slesarev AI, Kozyavkin SA, Khromov I, Ackermann HW. Genome comparison and proteomic characterization of *Thermus thermophilus* bacteriophages P23-45 and P74-26: Siphoviruses with triplex-forming sequences and the longest known tails. *J. Mol. Biol.* 378: 468-480 (2008)
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201 (1998)
- Nakao H, Kataoka C, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yamasaki S, Takeda T. Monoclonal antibody to shiga toxin 1, which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. *Microbiol. Immunol.* 46: 777-780 (2002)
- O'Flynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, Coffey A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3417-3424 (2004)
- Oliveira A, Sillankorva S, Quinta R, Henriques A, Sereno R, Azeredo J. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1919-1927 (2009)
- Raya RR, Varey P, Oot RA, Dyen MR, Callaway TR, Edrington TS, Kutter EM, Brabban AD. Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157: H7 levels in sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6405-6410 (2006)
- Sanekata T, Fukuda T, Miura T, Morino H, Lee C, Maeda K, Araki K, Otake T, Kawahata T, Shibata T. Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. *Biocontrol Sci.* 15: 45-49 (2010)
- Santos TMA, Gilbert RO, Caixeta LS, Machado VS, Teixeira LM, Bicalho RC. Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages. Part II: In vitro antimicrobial activity evaluation of a bacteriophage cocktail and several antibiotics. *J. Dairy Sci.* 93: 105-114 (2010)
- Sass P, Bierbaum G. Lytic activity of recombinant bacteriophage 11 and 12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 347-352 (2007)
- Smith JL, Fratamico PM, Gunther IV NW. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Adv. Appl. Microbiol.* 86: 145-197 (2014)
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Ch.* 45: 649-659 (2001)
- Tzipilevich E, Habusha M, Ben-Yehuda S. Acquisition of phage sensitivity by bacteria through exchange of phage receptors. *Cell* 168: 186-199 (2017)