

박테리오파지 증폭 기법을 활용한 시가 독소 생성 병원성 대장균의 신속 검출

백다윤¹ · 박종현¹ · 조석철² · 이영덕^{2,*}
¹가천대학교 식품생물공학과, ²서원대학교 식품공학과

Rapid detection of shiga-toxin producing *E. coli* by bacteriophage amplification assay

Da-Yun Baek¹, Jong-Hyun Park¹, Seok-Cheol Cho², and Young-Duck Lee^{2,*}

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 bacteria and can cause severe foodborne disease. For STEC detection, conventional culture methods have disadvantages in the fact that conventional culture takes a long time to detect and PCR can also detect dead bacteria. To overcome these problems, we suggest a bacteriophage amplification assay, which utilizes the ability of bacteriophages to infect living cells and their high specificity. We used a combination of six bacteriophages infecting *E. coli* to make the bacteriophage cocktail and added ferrous ammonium sulfate as a virucidal agent to remove free-bacteriophages. When cherry tomato and paprika were artificially inoculated with the cocktail at a final concentration of around 3 log CFU/mL and were enriched for at least 5 h in mTSB broth with Novobiocin, approximately 2-3 log PFU/mL were detected through the bacteriophage amplification assay. Therefore, bacteriophage amplification assay might be convenient and a useful method to detect STEC in a short period of time.

Keywords: Bacteriophages, amplification, rapid detection, shiga-toxin, *E. coli*

서 론

최근 전세계적으로 식품 안전 관리에 대한 중요성에 따라 식중독 세균 제어 기술, 검출 기술 및 식품 안전 관리 기술 등이 발전하고 있으나, 여전히 식중독 사고는 지속적으로 발생하고 있다. 또한 대부분의 식중독 사고의 약 90% 이상이 세균성 식중독으로 병원성 대장균(pathogenic *E. coli*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 살모넬라(*Salmonella*), 리스테리아(*Listeria*) 등이 알려져 있으며 몇몇 주요 병원성 미생물에 의한 식중독 사고는 인간의 건강에 치명적인 질병을 야기할 뿐만 아니라 전 세계적으로 다수의 사망 사고 및 큰 경제적 손실을 일으키고 있다. 특히 병원성 대장균인 시가독소 생성 대장균(Shiga-toxin producing *E. coli*)는 설사증, 출혈성 대장염, 용혈성요독후증군(hemolytic uremic syndrome) 등을 유발하며 매우 중요한 식중독 세균으로 알려져 있다(Nataro와 Kaper, 1988; Lee와 Park, 2015).

이러한 시가독소 생성 대장균에 의해 생산된 세포독소는 신장의 배로세포에 독성을 나타내어 배로 독소(Vero toxin)라 부르며, *Shigella dysenteriae*에 의해 생산된 시가 독소(Stx)와 유전적 및 단

백질 수준에서 동일하기에 시가 유사 독소(Shiga-like toxin)라고도 불린다(Nataro와 Kaper, 1998; Nakao 등, 2002; Kaper 등, 2004). 시가독소 생성 대장균은 현재까지 약 100여종의 혈청형이 알려져 있으며, 이 중 *E. coli* O157:H7이 주된 혈청형으로 시가독소 생성 대장균 중 가장 잘 알려져 있다(Law, 2000; Majowicz 등, 2014; Smith 등, 2014). *E. coli* O157:H7 이외에도 상대적으로 병원성은 낮으나 발생률이 최근 지속적으로 증가하고 있는 non-O157 시가독소 생성 대장균이 보고되고 있으며, 대표적인 혈청형으로 *E. coli* O26, *E. coli* O45, *E. coli* O103, *E. coli* O111, *E. coli* O121, *E. coli* O145이 알려져 있다(Brooks 등, 2005; Gould 등, 2013). 또한 non-O157 시가독소 생성 대장균에 의해서 식중독이 매년 36,000건 발생되고 있으며, 1,000명 병원 치료, 30명 사망을 일으키는 것으로 보고되고 있으며, 시가독소 생성 대장균에 의한 식중독 사고 중 약 20-50%를 차지하는 것으로 알려져 있다(Hughes 등, 2006; Kaper 등, 2004; Nataro와 Kaper, 1998).

이에 따라 시가독소 생성 대장균에 대한 제어를 위해 다양한 물리적 방법, 화학적 방법, 생물학적 방법, 병행 처리 방법 등 다양하게 연구되고 있으며, 현장에서 사용 가능한 다양한 응용방법들이 시도되고 있다(Torres 등, 2018). 하지만 이미 오염된 시가독소 생성 대장균에 대해 물리화학적 다양한 처리를 통한 제어도 중요하지만, 시가독소 생성 대장균의 관리를 위해서는 오염을 사전에 방지하거나 오염된 식중독 유발 세균의 정확하고 신속한 검출이 필요할 것으로 판단된다.

최근 시가독소 생성 대장균을 포함하여 다양한 식중독 세균의 생물학적 제어를 위해 박테리오파지를 활용하는 연구가 활발하

*Corresponding author: Young-Duck Lee, Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju, Chungbuk 28674, Korea

Tel: +82-43-299-8472

Fax: +82-43-299-8470

E-mail: ydlee@seowon.ac.kr

Received January 15, 2020; revised February 3, 2020;

accepted February 5, 2020

게 이루어지고 있다. 박테리오파지는 1910년대에 처음 발견되었으며, 세균을 숙주로 하여 세균에 침투하는 세균성 바이러스를 칭한다. 박테리오파지는 특이적으로 특정 균에만 침투하고 용원성 박테리오파지인 경우, 숙주인 세균의 대사과정을 방해하고 용원시키는 특징이 있다(Sulakvelidze 등, 2001). 이러한 특징을 이용하여 박테리오파지는 다양한 식중독 세균의 제어와 식품과 접촉한 표면이나 기구들을 소독 및 표면에 생성된 biofilm을 제거하는 소독제로 활용되고 있다(Oliveira 등, 2009). 이 외에도 박테리오파지 유전자를 이용한 용균 효소 등의 유용 효소의 생산, 병원성 세균의 검출 및 분류, 박테리오파지 유전자의 전이 등 매우 광범위하게 연구가 되고 있다(Guglielmotti 등, 2012; Lienemann 등, 2015; Tzipilevich 등, 2017).

특히 최근 박테리오파지가 갖는 숙주 특이성 특성을 기반으로 하여 식중독 세균을 비롯한 병원성 세균의 검출에 대한 연구가 진행되고 있다. 대표적으로 박테리오파지의 DNA에 YOYO-1, DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), SYBR Gold 등의 형광 염색을 하여 형광현미경 또는 flow cytometry 등의 검경을 통해 검출하는 방법 박테리오파지 표지법(Park 등, 2018)과 GFP (Green fluorescent protein), luciferase 등의 특정 형광 관련 유전자를 박테리오파지에 삽입하여 감염 후 형광 강도를 확인하여 검출하는 제조합 박테리오파지법과 박테리오파지가 숙주를 감염시킨 후 용균성 생활환(lytic cycle) 후 숙주를 사멸시키면서 만들어지는 plaque의 형성 유무를 확인하는 박테리오파지 증법 기법 등이 알려져 있다(Oliveira 등, 2012; Park 등, 2003; Stewart 등, 1998). 박테리오파지 증법 기법의 경우 식중독 세균의 검출이 다른 박테리오파지 검출 기법에 비해 실험 방법이 상대적으로 간단하며, 적은 비용으로도 검출이 가능한 장점이 있다. 그리고 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), 리스테리아, 살모넬라 등의 검출을 위해 박테리오파지 증법 기법을 적용한 연구가 해외에서는 진행 중에 있으며, *M. tuberculosis*의 경우 해당 기술을 이용하여 신속 진단 키트 개발을 통해 병원에서 활용 중에 있는 것으로 알려져 있다(Park 등, 2003). 국내에서도 박테리오파지를 이용하여 식중독 세균 검출에 대한 연구가 시도되고 있으나, 박테리오파지 증법 기법을 활용한 연구 보고는 다소 미흡한 것으로 판단된다. 따라서, 본 연구에서는 시가독소 생성 대장균에 대한 신속 검출을 위해 박테리오파지 증법 기법을 이용하여 검출하고자 하였다.

재료 및 방법

시가독소 생성 대장균의 박테리오파지 분리

시가독소 생성 대장균의 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 숙주 균주로 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 mM CaCl₂이 첨가된 Luria Bertani broth (LBC, Difco Laboratory, Detroit, MI, USA)에 접종 37°C에서 24시간 배양한 후 실험에 사용했다. 토양, 오수, 분변 등의 시료를 PBS buffer (10 mM PO₄³⁻, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.4)에 1:2 비율로 혼합하여 상온에서 150 rpm으로 2시간 동안 진탕 시킨 후, 8000 g에서 20분간 원심분리를 하여 상층액을 얻었다. 상층액을 LBC broth와 1:10 비율로 섞어 균질화하고, LBC broth에서 전 배양된 약 8-9 log CFU/mL 수준의

숙주균을 각각 100 µL씩 접종한 후 37°C, 150 rpm으로 24시간 배양하였다. 배양액을 8000 g에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 0.22 µm syringe filter (Millipore, MA, USA)를 이용해 제거하였다. 제거된 상층액을 이용하여 LBC agar에 plaque assay를 수행하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 생성된 plaque는 형태학적인 특성에 따라 single plaque로 순수 분리하였다.

형태학적 특성 분석

형태학적 특성을 분석하기 위해서 투과 전자현미경을 이용하였다. 분리된 박테리오파지 용액을 2 M NaCl이 첨가된 20% 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG) 8000 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 약 10-11 log PFU/mL 수준으로 농축하여 사용하였다. 농축된 박테리오파지 용액을 25,000 g, 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 제거하는 방법으로 한번 더 농축하였다. 한번 더 농축된 박테리오파지 용액을 1X SM buffer (10 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 0.01% gelatin, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 이용하여 수세과정을 2회 반복하였다. 박테리오파지 용액을 carbon coating 된 copper grid (200 mesh, Ted Pella, Redding, CA, USA)에 2분간 부착시키고 멸균된 증류수로 수세한 후 수분을 제거하였다. 그 후 동량의 2% uranyl acetate로 30초간 염색하고 증류수로 수세하여 실온에서 건조시켰다. 그리고 negative stain을 수행한 후 투과 전자 현미경(H-7600, HITACHI, Tokyo, Japan)을 통하여 80 kV의 전압에서 30,000배율로 관찰하였다.

박테리오파지 DNA 추출과 제한효소절단 패턴 분석

농축된 파지용액을 20 µg/mL의 DNase와 RNase (Sigma Aldrich)를 처리한 후 약 15분 동안 37°C에서 배양하고 10 mg/mL proteinase K (Sigma)와 150 µL lysis buffer (0.5 M EDTA, 10% SDS, 1 M Tris (pH 8.0))을 첨가하였다. 그리고 65°C에서 30분 동안 반응하고 700 µL phenol:chloroform:isoamyl alcohol (Sigma Aldrich)을 첨가한 후 10분 동안 17,000 g에서 원심분리를 수행하였다. 그리고 상층액을 위해 chloroform:isoamyl alcohol을 첨가하고 동일하게 원심분리를 수행한 후 상층액을 위해 에탄올로 침전하고 수세한 후 증류수로 현탁하고 80°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 제한효소의 절단 패턴은 제한효소의 특성에 따라 조건을 조정하여 실험을 수행하였으며, 제한효소 처리 후 절단된 DNA의 패턴은 전기영동을 통해 확인하였다.

숙주 저해 특성

분리된 시가독소 생성 대장균에 대한 박테리오파지를 대상으로 하여 18주의 *E. coli* O157과 26주의 non-O157 시가독소 생성 대장균에 대해 숙주저해범위를 spot assay를 수행하여 확인하였다. LBC broth에서 계대 배양된 44주의 시가독소 생성 대장균을 LBC soft agar에 분주하고 LBC agar에 증첩한 후, 분리된 대장균 박테리오파지 용액을 10 µL씩 분주하고 37°C에서 24시간 배양하여 plaque 형성을 확인하였다.

Ferrous Ammonium Sulfate를 이용한 박테리오파지 제거 효과

살바이러스제(Virucidal agent)로 알려진 Ferrous Ammonium Sulfate (FAS, Sigma Aldrich)를 사용하여 비감염 박테리오파지의 제거에 이용하고자 하였다. FAS 처리는 박테리오파지 용액을 20%로 제조한 FAS 와 1:1 비율로 처리하여 최종농도(v/v)가 10%가 되도록 하였다. 그리고 상온에서 10분, 30분을 처리한 후 LBC agar에 double overlay agar법을 통한 plaque assay법을 수행하였

다. 또한 FAS 용액이 숙주균의 생육에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 약 7 log CFU/mL의 숙주균을 10% FAS 처리 후 멸균 생리식염수를 이용해 수세를 수행 후 잔여 FAS 제거 과정을 거친 뒤 LBC agar에 도말하여 생육 정도를 확인하였다.

시가독소 생성 대장균의 박테리오파지 증폭 기법을 통한 검출

박테리오파지 증폭 기법은 Stewart 등(1998)의 방법을 기반으로 수정하여 진행하였다. 시가독소 생성 대장균의 검출 한계를 평가하기 위해 약 4, 6, 8 log CFU/mL로 각각 배양된 *E. coli* NCCP 13937과 약 7-8 log PFU/mL 박테리오파지 혼합 용액을 1:1로 혼합하고 37°C, 150 rpm에서 10분 동안 반응시킨 후 10,000 g에서 2분 동안 원심분리를 통해 상층액을 제거하였다. 침전된 세포에 10% (v/v) FAS용액 500 µL로 현탁한 후 상온에서 5분 동안 반응시켰다. 그리고 박테리오파지가 감염된 균을 1X phosphate buffer saline (PBS) 용액으로 2회 수세하였다. 원심분리를 통해 1X PBS 용액을 제거해주고 LBC 배지로 침전된 세포를 현탁한 뒤 37°C, 150 rpm에서 1시간 동안 박테리오파지가 증폭되도록 하였다. 배양한 용액은 원심분리 후 상층액만 취하여 indicator bacteria인 *E. coli* NCCP 13937과 plaque assay를 진행하였다. 37°C에서 배양한 후 plaque 형성 여부를 확인하였다. 또한 박테리오파지 혼합액을 약 4, 6, 8 PFU/mL로 조정하여 각각을 약 8 log CFU/mL의 *E. coli* NCCP 13937을 위와 동일한 방법으로 수행하여 사용 가능한 박테리오파지 농도를 확인하고자 하였다.

식품 중 시가독소 생성 대장균의 검출

신선식품인 방울토마토, 파프리카를 1X PBS로 세척해주고 각각의 시료에 6 log CFU/mL의 *E. coli* NCCP 13930을 250 µL씩 골고루 분주하여 점 접종해준 뒤 30분 동안 안정화 시켰다(Elhariry, 2011; Patel과 Sharma, 2010). 안정화 시킨 식품에 novobiocin (Sigma Aldrich)이 첨가된 Modified Tryptone Soya Broth (mTSB, Oxoid, Hampshire, UK) 225ml을 직접 넣어 최종 균 농도가 3 log CFU/mL이 되도록 하였다. 37°C에서 배양하며 시간에 따른 *E. coli* NCCP 13930의 생육 정도를 선택배지인 EMB agar에서 10진 희석 후 도말하여 측정하였다. 그리고 증균 시간에 따른 *E. coli* NCCP 13930에 대해 박테리오파지 증폭 기법을 통해 시가독소 생성 대장균 검출하였다.

결과 및 고찰

시가독소 생성 대장균의 박테리오파지 분리 및 형태학적 특성

박테리오파지 증폭 기법에 활용한 시가독소 생성 대장균에 대한 박테리오파지는 Lim 등(2018)이 보고한 ECP33과 NOECP91 박테리오파지와 신규의 박테리오파지를 토양, 오수, 분변 등으로부터 분리된 것을 사용하였다. 기분리된 박테리오파지인 ECP33과 NOECP91의 경우 *Myoviridae* family에 속하는 것으로 보고하였다. 그리고 시가독소 생성 대장균에 대한 신규의 ECP26, ECP27, ECP32, NOECP32 박테리오파지를 분리하여 전자현미경을 통한 형태학적 특성을 확인한 결과 모두 *Myoviridae*가 가지고 있는 수축성 꼬리를 가지고 있는 것으로 나타났다(Fig. 1). 일반적으로 자연계에 존재하는 박테리오파지는 약 95% 정도가 이중나선 DNA를 갖는 박테리오파지로 알려져 있으며, 비수축성 꼬리를 갖는 *Siphoviridae*, *Myoviridae*, 짧은 경직성 꼬리를 가지고 있는 *Podoviridae* 순으로 존재하는 것으로 알려져 있다(Ackermann, 2003; Hendrix, 2003). *E. coli* O157 및 시가독소 생성 대장균에 대한 연구 결과들에서도 *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*에

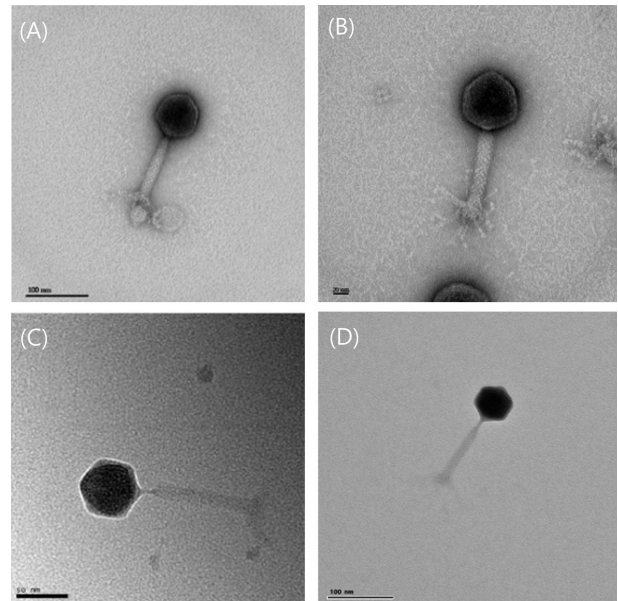


Fig. 1. Morphological characterization of bacteriophages for shiga-toxin producing *E. coli* by transmission electron microscopy. (A) ECP26, (B) ECP27, (C) NOECP32, and (D) ECP32

속하는 박테리오파지들이 다양하게 보고되고 있다. 또한 Kim 등 (2016)은 *Myoviridae*가 *Siphoviridae*에 비해 숙주 저해 범위가 넓은 것으로 보고하고 있으며, Dini와 Urraza(2010)는 분리된 coliphage 중 non-O157:H7을 숙주균주로 사용하여 분리된 coliphage는 모두 *Myoviridae*로 나타났다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 시가독소 생성 대장균의 검출을 위한 박테리오파지 증폭 기법에 사용될 박테리오파지는 *Myoviridae*에 속하는 것으로 확인되어 *Siphoviridae* 보다 효율적일 것으로 판단된다.

제한효소절단 패턴 분석과 숙주 저해 특성

박테리오파지 증폭 기법에 사용될 박테리오파지는 형태학적 특성이 모두 *Myoviridae*에 속하는 것으로 확인되어 이것들에 대한 차이점을 확인하기 위해 박테리오파지 DNA에 대한 제한효소 처리에 따른 절단 패턴 확인과 시가독소 생성 대장균에 대한 숙주 저해 특성을 확인하고자 하였다. Fig. 2에서 각각의 박테리오파지 DNA를 제한효소 처리하여 나타난 절단 패턴은 서로 상이한 것으로 확인되어 박테리오파지의 염기 서열에 차이가 있는 것으로 판단된다. 그리고 박테리오파지에 대한 숙주 저해 특성을 확인한 결과는 Table 1과 같다. 시가독소 대장균 이외에 *Salmonella enterica*, *Cronobacter sakazakii*, 황색포도상구균은 감염시키지 못하는 것으로 나타났으며, 시가독소 생성 대장균들에 대한 숙주 저해 특성은 차이가 나타나는 것으로 확인되었다. ECP26의 경우 *E. coli* O157:H7 표준 균주에서 약 78%, non-O157 시가독소 생성 대장균 표준 균주는 약 85%로 숙주 저해능이 확인되었다. 또한 *E. coli* O157:H7 표준 균주와 non-O157 시가독소 생성 대장균 표준 균주에 대해 ECP27은 약 50%와 65%, ECP32는 약 33%와 58%, ECP33은 약 56%와 38%, NOECP32는 약 44%와 73%, NOECP91은 약 44%와 69%로 숙주 감염이 가능한 것으로 나타났다. 또한 본 연구에 사용될 박테리오파지들은 시가독소 생성 대장균 44주에 대해 모두 감염이 가능한 것으로 확인되었다. Raya 등(2006)은 17주의 *E. coli* O157:H7과 다른 혈청형인 *E. coli* O43 및 *E. coli* O126에 대해서 감염이 가능한 것으로 보고

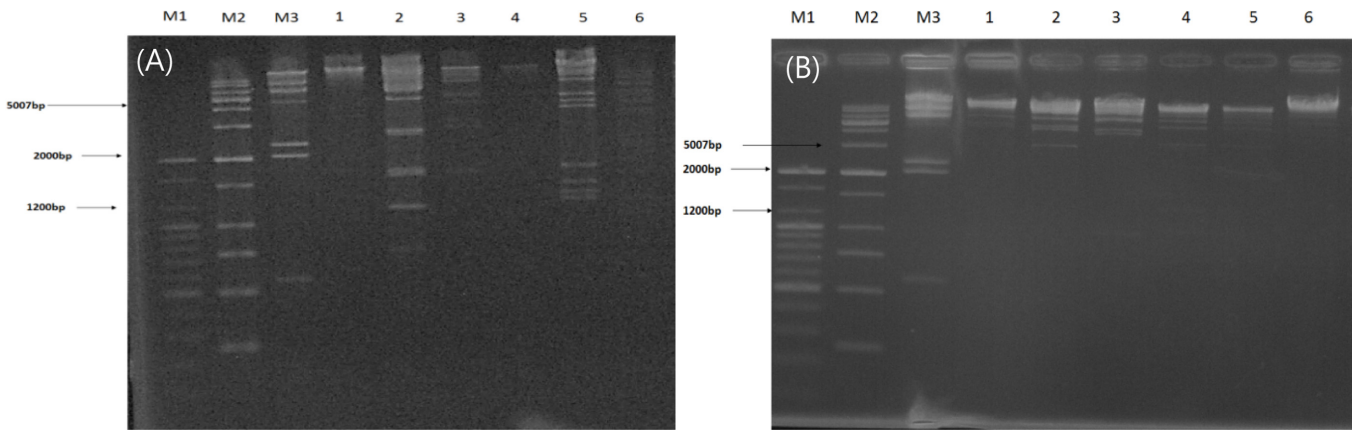


Fig. 2. The pattern of digested DNA by (A) *EcoRI* and (B) *SmaI*. M1: 100 bp marker, M2: 1,000 bp marker, M3: Lambda marker, 1: ECP26, 2: ECP27, 3: ECP32, 4:ECP33, 5: NOECP32, 6: NOECP91

Table 1. Host spectrum of bacteriophages on shiga-toxin producing *E. coli*

Bacteriophage	Host spectrum		Total
	<i>E. coli</i> O157 type strain	<i>E. coli</i> non-O157 type strain	
ECP26	14/18	22/26	36/44
ECP27	9/18	17/26	26/44
NOECP32	8/18	19/26	27/44
ECP32	6/18	15/26	21/44
ECP33	10/18	10/26	20/44
NOECP91	10/18	18/26	28/44

하였으며, Kim 등(2016)도 *E. coli* O55, O91, O103, O111, O117 및 O179에서 50% 이상 저해가 가능한 것으로 보고했다. 박테리오파지 증폭 기법에 활용될 박테리오파지들을 혼합액 형태로 사용시에 서로 다른 혈청형을 갖는 시가독소 생성 대장균에 대해 100% 감염이 가능한 것으로 나타났기 때문에 시가독소 생성 대장균 검출에 이용이 가능한 것으로 보여진다.

Ferrous ammonium sulfate를 이용한 박테리오파지 제거 효과

시가독소 생성 대장균의 검출을 위한 박테리오파지 증폭 기법에서 가장 중요한 것은 박테리오파지를 목적 세균에 감염 후에 감염되지 않은 박테리오파지를 효과적으로 제거하는 것이 가장 중요한 것으로 알려져 있다. 이를 위해 살바이러스제로 많이 사용되는 10% ferrous ammonium sulfate (FAS)를 사용하여 비감염 박테리오파지에 대한 제거 효과를 확인하고자 하였다. 약 7-9 log

PFU/mL 수준의 박테리오파지와 박테리오파지 혼합액을 10분과 30분 동안 FAS를 처리한 결과 박테리오파지는 검출되지 않았다 (Table 2). 또한 FAS를 숙주균에 처리한 후 생육에 미치는 영향을 확인한 결과, 10분, 30분 처리 후에도 초기 균수인 약 7 log CFU/mL로 나타나 균의 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(data not shown). 이를 통해서 10% FAS는 숙주에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되며 10% FAS 처리 용액에서 plaque가 형성된 결과(Table 3)를 통해 이미 숙주균에 감염된 박테리오파지는 10% FAS의 영향을 받지 않는 것으로 판단된다. McNerney 등(1998)은 *M. smegmatis*가 100 mM FAS에 대하여 안정적인 것을 보여줬으며, 박테리오파지가 감염된 경우에도 FAS의 영향을 받지 않는다고 보고되고 있으며, ferrous sulfate와 차 추출물을 혼합하여 살바이러스제로 사용한 경우에도 균의 생육에는 영향을 미치지 않는다고 하였다(de Siqueira 등, 2006). 이렇듯 살바이러스제로 FAS는 일반적으로 많이 사용되고 있고 최근에는 추가적으로 차 추출물, 석류추출물, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 등도 활용이 되고 있는 것으로 보고되고 있다(de Siqueira 등, 2006; Ly-chatain 등, 2013; Park 등, 2003; Stewart 등, 1998). 따라서, 박테리오파지 증폭 기법에 살바이러스제로서 10% FAS를 사용하여 비감염 박테리오파지 제거에 사용하고자 하였다.

시가독소 생성 대장균의 박테리오파지 증폭 기법을 통한 검출

시가독소 생성 대장균에 대해 박테리오파지 혼합액을 활용하여 박테리오파지 증폭 기법을 통해 검출하고자 하였으며, 이를 위해 박테리오파지와 시가독소 생성 대장균인 *E. coli* NCCP 13937의 농도에 따른 검출 한계를 확인하였다. *E. coli* NCCP 13937의 경우 약 4 log PFU/mL에서는 plaque가 형성되지 않았으나, 약 6 log

Table 2. Viability loss of bacteriophages by 10% ferrous ammonium sulfate

Host	Bacteriophage	Inoculation titer (log PFU/mL)	10 min	30 min
<i>E. coli</i> NCCP 13930	ECP26	7.70	-	-
	ECP32	7.72	-	-
	ECP33	9.06	-	-
<i>E. coli</i> NCCP 13937	NOECP32	7.70	-	-
<i>E. coli</i> NCCP 13934	NOECP43	9.02	-	-
<i>E. coli</i> NCCP 13937	NOECP91	8.18	-	-
<i>E. coli</i> NCCP 13930	Bacteriophage cocktail	8.72	-	-

Table 3. Detection level of *E. coli* NCCP13930 by bacteriophage amplification assay

	<i>E. coli</i> NCCP13930			
	8 log CFU/mL	6 log CFU/mL	5 log CFU/mL	4 log CFU/mL
Quantification of bacteriophage cocktail (log PFU/mL)	3.82±0.6	1.2±0.1	1.33±0.2	0.33±0.33

Table 4. Detection of *E. coli* NCCP13930 in cherry tomato and paprika by bacteriophage amplification assay

Time	Cherry tomato		Paprika	
	Bacteria (log CFU/mL)	Bacteriophages (PFU/mL)	Bacteria (log CFU/mL)	Bacteriophages (PFU/mL)
1 h	4.7	2.68±0.55	3.90	1.65±0.88
3 h	6.9	3.33±0.2	4.95	2.12±0.49
5 h	7.7	>3.316	6.95	3.24±0.25

PFU/mL 이상의 *E. coli* NCCP 13937가 존재할 경우 plaque가 나타나는 것으로 확인되었다(data not shown). 따라서, 시가독소 생성 대장균의 검출에 사용될 박테리오파지 혼합액은 약 6 log PFU/mL 보다 높은 농도인 약 7-8 log PFU/mL로 수행하고자 하였다. 그리고 약 7-8 log PFU/mL 수준의 박테리오파지 혼합액을 *E. coli* NCCP13930의 세포양에 따라 검출한계를 비교한 결과 약 4-5 log CFU/mL 수준부터 효과적인 검출이 가능한 것으로 나타났다(Table 3). Derda 등(2013)은 0-5000 CFU/mL의 *E. coli*를 박테리오파지 증폭법을 통해 검출한 결과, 5 CFU/10 mL의 경우 1100±500 PFU가 형성되면서 충분히 검출할 수 있었다. 이는 본 실험보다 더 적은 균에서 효과적인 검출이 가능하다는 것을 보여주고 있다. 이렇게 검출한계가 차이는 원인은 syringe filter를 통해 박테리오파지와 *E. coli*를 확실하게 구분 하였으며 ferrous ammonium sulfate 반응 후 sodium citrate를 통해 filter에 잔존하던 철 이온을 제거해줌으로써 박테리오파지가 더 안정적으로 증폭될 수 있도록 했기 때문으로 보여진다. 또한 박테리오파지 증폭법이 아닌 형광 염색을 통한 검출법에선 *Pseudomonas aeruginosa*의 농도가 약 1 log CFU/mL일 때 4시간 이내로 검출이 가능하다고 하였다. 이는 현저히 낮은 검출한계이고 시간도 단축되어 효율이 높은 장점을 가진다. 하지만 증폭되는 박테리오파지를 유전적으로 변형시켜야 효율적인 검출이 가능하다는 단점이 있다(Jassim과 Griffiths, 2007). 따라서 박테리오파지 증폭 기법은 다른 박테리오파지를 이용한 검출 기법에 비해 상대적으로 간단하며, 유전자 조작 기술 등 특별한 작업을 필요로 하지 않기 때문에 비숙련자도 실험이 가능하다. 또한 실험 비용이 적어 경제성이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서, 해당 기술을 통한 시가독소 대장균에 대한 검출에 적용하기 용이할 것으로 판단된다.

식품 중 시가독소 생성 대장균의 검출

신선식품인 방울토마토와 파프리카에 약 3 log CFU/mL 수준으로 *E. coli* NCCP 13930을 접종한 후 박테리오파지 증폭 기법을 통해 검출하고자 하였다(Table 4). 방울토마토의 경우 1시간 증균 이후에 약 4 log CFU/mL의 *E. coli* NCCP 13930에서 약 2 log PFU/mL의 plaque가 확인되었으며, 3-5시간 동안 증균이 진행된 후에는 plaque가 약 3 log PFU/mL 이상의 수준으로 나타났다. 그리고 파프리카도 1시간 증균 후에 약 3.9 log CFU/mL로 나타났으며, 이때의 plaque는 약 1.6 log PFU/mL로 확인되었다. 또한 3-5시간 이후에는 *E. coli* NCCP 13930의 세포수가 증가함에 따라 약 2-3 log PFU/mL 수준로 plaque가 확인되었다. 이는 plaque 형성 유무를 통한 결과이기 때문에 정성적인 검출에 해당

하며 기본적으로 이들 이상 소요되는 전통적인 검출법 보다 빠른 시간 내에 효율적으로 시가독소 생성 대장균을 검출 할 수 있다는 것을 보여주고 있다. 최근에는 본 연구와 같이 배지에서 배양된 균을 검출하는 것에서 그치지 않고 양상추, 닭고기, 소고기, 탈지분유 등 다양한 식품 시료에서 식품유래 균을 직접 검출한 결과를 통해 박테리오파지를 이용한 검출법의 간편성 및 정확성이 강조되고 있다(Favrin 등, 2003; Garrido-Maestu 등, 2019; Oliveira 등, 2012).

본 연구를 통해 박테리오파지 증폭 기법은 시가독소 생성 대장균에 대한 검출에 효과적으로 적용될 수 있을 것으로 보여진다. 이는 기존에 전통적인 시가독소 생성 대장균에 대한 검사법이나 PCR 등의 기법에 추가적인 검출 방법으로 활용이 가능할 것으로 판단된다. 또한 기존에 박테리오파지 증폭 기법을 활용한 *M. tuberculosis*의 검출 키트와 유사한 형태의 시가독소 생성 대장균에 대한 신속 검출 키트 개발이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 식품에서 문제가 되는 시가독소생성 대장균(STEC)을 박테리오파지 증폭 기법을 통해 검출하고자 시가독소 생성 대장균에 대한 박테리오파지를 분리하였고 분리된 4종의 파지와 기 분리된 2종의 박테리오파지를 혼합하여 사용하였다. 분리된 박테리오파지는 형태학적 특성 및 제한효소 절단 패턴 등을 통해서 동정하였다. 5종의 파지는 *E. coli* O157:H7 및 non-O157 시가독소 생성 대장균을 모두 저해하는 특징을 가지는 것으로 나타났다. 박테리오파지 증폭 기법에서 중요한 단계인 세균에 감염되지 않은 박테리오파지를 제거하기 위해 10% (v/v) ferrous ammonium sulfate (FAS)을 사용하였으며 약 7-9 log PFU/mL 수준의 박테리오파지를 10분 내로 제거하는 것을 확인하였다. 시가독소 생성 대장균인 *E. coli* NCCP 13937을 검출하기 위해서는 약 6 log PFU/mL 이상의 박테리오파지 혼합액의 농도 및 약 4-5 log CFU/mL 이상의 목표 균주가 필요한 것으로 나타났다. 이러한 조건을 바탕으로 실제 판매되고 있는 신선식품에서 시가독소생성 대장균을 검출한 결과, 5시간 이내에 증폭된 약 2-3 log PFU/mL의 plaque를 통해 검출이 가능한 것을 확인하였다. 따라서 본 연구를 통해 박테리오파지 혼합액을 이용한 증폭 기법을 통해 시가독소 생성 대장균의 오염 여부를 보다 효율적으로 확인할 수 있음을 보여주었고 이를 적용한 제품을 개발하여 검출 단계의 간편화가 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2019년도 농림식품기술기획평가원의 연구개발비 지원(117060-3)에 의해 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)
- de Siqueira R, Dodd C, Rees C. Evaluation of the natural virucidal activity of teas for use in the phage amplification assay. *Int. J. Food Microbiol.* 111: 259-262 (2006)
- Derda R, Lockett MR, Tang SK, Fuller RC, Maxwell EJ, Breiten B, Cuddemi CA, Ozdogan A, Whitesides GM. Filter-based assay for *Escherichia coli* in aqueous samples using bacteriophage-based amplification. *Anal. Chem.* 85: 7213-7220 (2013)
- Dini C, Urraza PJ. Isolation and selection of coliphages as potential biocontrol agents of enterohemorrhagic and Shiga toxin-producing *E. coli* (EHEC and STEC) in cattle. *J. Appl. Microbiol.* 109: 873-887 (2010)
- Elhariry HM. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food microbiol.* 28: 1266-1274 (2011)
- Favrin SJ, Jassim SA, Griffiths MW. Application of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in food. *Int. J. food microbiol.* 85: 63-71 (2003)
- Garrido-Maestu A, Fucios P, Azinheiro S, Carvalho C, Carvalho J, Prado M. Specific detection of viable *Salmonella Enteritidis* by phage amplification combined with qPCR (PAA-qPCR) in spiked chicken meat samples. *Food control.* 99: 79-83 (2019)
- Gould LH, Mody RK, Ong KL, Clogher P, Cronquist AB, Garman KN, Lathrop S, Medus C, Spina NL, Webb TH. 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 ADL. Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front. Microbiol.* 2: 282 (2012)
- Hendrix RW. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 506-511 (2003)
- Hughes JM, Wilson ME, Johnson KE, Thorpe CM, Sears CL. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.* 43: 1587-1595 (2006)
- Jassim S, Griffiths M. Evaluation of a rapid microbial detection method via phage lytic amplification assay coupled with Live/Dead fluorochromic stains. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 673-678 (2007)
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 123-140 (2004)
- 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 (2016)
- Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.* 88: 729-745 (2000)
- 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)
- Lim GY, Park DW, Lee YD, Park JH. Isolation and characterization of bacteriophages for the control of Shiga Toxin-producing *E. coli*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 50: 594-600 (2018)
- Ly-Chatain MH, Moussaoui S, Vera A, Rigobello V, Demarigny Y. Antiviral effect of cationic compounds on bacteriophages. *Front. Microbiol.* 4: 46 (2013)
- 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)
- McNerney R, Wilson S, Sidhu A, Harley Va, Al Suwaidi Z, Nye P, Parish T, Stoker N. Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. *Res. Microbiol.* 149: 487-495 (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)
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201 (1998)
- 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)
- Oliveira I, Almeida RCdC, Hofer E, Almeida PF. Bacteriophage amplification assay for detection of *Listeria* spp. using virucidal laser treatment. *Braz. J. Microbiol.* 43: 1128-1136 (2012)
- Park DJ, Drobniowski F, Meyer A, Wilson S. Use of a phage-based assay for phenotypic detection of mycobacteria directly from sputum. *J. Clin. Microbiol.* 41: 680-688 (2003)
- Park WJ, Lim GY, Park JH. Enumeration of *Weissella cibaria* phage with cytometry, epifluorescence microscopy, and plaque assay. *Korean J. Food Sci. Technol.* 50: 244-247 (2018)
- Patel J, Sharma M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J Food Microbiol.* 139: 41-47 (2010)
- 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)
- Smith JL, Fratamico PM, Gunther IV NW. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Adv. Appl. Microbiol.* 86: 145-197 (2014)
- Stewart GS, Jassim SA, Denyer SP, Newby P, Linley K, Dhir VK. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. *J. Appl. Microbiol.* 84: 777-783 (1998)
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45: 649-659 (2001)
- Torres AG, Amaral MM, Bentancor L, Galli L, Goldstein J, Krger A, Rojas-Lopez M. Recent advances in shiga toxin-producing *Escherichia coli* research in Latin America. *Microorganisms* 6: 100-118 (2018)
- Tzipilevich E, Habusha M, Ben-Yehuda S. Acquisition of phage sensitivity by bacteria through exchange of phage receptors. *Cell* 168: 186-199 (2017)