



## Studies on *Shigella sonnei*-specific bacteriophage isolated from a slaughterhouse

Min-Jeong Lee<sup>1</sup>, HyungWoo Kim<sup>1</sup>, WooJu Kim<sup>1</sup>, JinUk Jang<sup>1</sup>, JeongUk Seo<sup>1</sup>,  
 KyoungMin Gwak<sup>1</sup>, Jinjong Myoung<sup>3</sup>, Mi-Kyung Park<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>2</sup>Food and Bio-industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>3</sup>Korea Zoonosis Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

### 도축장에서부터 분리된 *Shigella sonnei* 특이적 박테리오파지의 특성 연구

이민정<sup>1</sup> · 김형우<sup>1</sup> · 김우주<sup>1</sup> · 장진욱<sup>1</sup> · 서정욱<sup>1</sup> · 광경민<sup>1</sup> · 명진종<sup>3</sup> · 박미경<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 식품공학부, <sup>2</sup>경북대학교 식품생물산업 연구소, <sup>3</sup>전북대학교 인수공통전염병연구소

#### Abstract

Continuous outbreaks of *Shigella* spp. have raised concerns about the lack of rapid and on-site applicable biosensor method for *Shigella* detection. Since a bacteriophage has recently been employed as an emerging bio-recognition element in biosensor method, *Shigella sonnei*-specific bacteriophage was isolated and purified from a slaughterhouse with the final concentration of  $2.0 \times 10^{12}$  PFU/mL in this study. Analysis of purified *S. sonnei*-specific bacteriophage using transmission electron microscopy indicated that it possessed an icosahedral head with a relatively long non-contractile tail. It was therefore classified as a member of the *Siphoviridae* family. Head width, head length, and tail length were  $69.9 \pm 11.2$  nm,  $77.5 \pm 8.8$  nm, and  $264.4 \pm 33.9$  nm, respectively. The genomic DNA size of the *S. sonnei*-specific bacteriophage was determined to be approximately 25 kb by using 0.4% agarose gel electrophoresis. In specificity test with 43 food-associated microorganisms, the *S. sonnei*-specific bacteriophage exhibited a clear plaque against *S. sonnei* only. In addition, the *S. sonnei*-specific bacteriophage was stable within a wide range of pH values (pH 3-11) and temperatures (4-37°C). Thus, the present study demonstrated the excellent specificity and stability of the *S. sonnei*-specific bacteriophage as a novel bio-recognition element for *S. sonnei* detection in foods.

**Key words :** *Shigella sonnei*, bacteriophage, bio-recognition, specificity, stability

#### 서론

*Shigella* spp.는 그람 음성, 비운동성, 포자를 형성하지 않는 간균으로 주요한 감염병균 중 하나이다. 신선 채소, 우유 및 유제품, 가공육, 어패류, 즉석 편이식품 등이 주요한 원인식품이며(1-3), 섭취 후 12-48시간 내에 설사, 발열, 복

부 경련, 탈수를 유발하여 Shigellosis를 야기시킨다(1,4). World Health Organization(WHO)는 전 세계적으로 연간 164.7백만 명이 감염되며, 10-200 정도의 세균수로도 Shigellosis를 유발할 수 있다고 보고하고 있다(1,4). *Shigella* spp.는 *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. dysenteriae*의 4가지 혈청형으로 나누어지며, 각각의 발병율은 84.9%, 8.7%, 0.3%, 0.1%로 *S. sonnei*가 압도적인 우위를 차지하고 있다(2-7). 또한 2013년 Centers for Disease Control and Prevention(CDC) 자료에 의하면, 조사한 1,600개의 식품 샘플에서 분리한 *Shigella* spp.균주의 89%가 항생제에 대해 내성을 갖는다고 보고 하였다(7).

대표적인 검출법의 하나인 배지 기반의 전통적인 검출법

\*Corresponding author. E-mail : parkmik@knu.ac.kr

Phone : 82-53-950-5776, Fax : 82-53-950-6772

Received 5 May 2018; Revised 29 May 2018; Accepted 4 June 2018.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

은 국제표준기구 Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Comité Européen de Normalization(CEN), Association Française de Normalization(AFNOR), Deutsches Institut für Normung(DIN) 등에서 채택된 표준시험방법(gold standard)이나 증균, 선택, 확인 과정을 거치면서 많은 시간과 노력이 소요되는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 Polymerase Chain Reaction(PCR)과 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA) 등과 같은 신속검출법이 개발되었고 이들 신속검출법은 비교적 높은 민감성과 특이성을 보여주었다(8-11). 하지만 이들 신속검출법은 DNA 정제와 같은 시료 준비과정이 필요하며, 숙련된 기술과 고가의 장비가 필수적이라는 한계 때문에 식품산업현장에서 손쉽게 사용하기에는 제한적이다(2,8-11). 따라서 1990년대 후반부터 주로 의료용으로 한정적으로 사용되어 왔던 바이오센서 기술이 식중독균 검출에 활용되어 왔다(12). 바이오센서는 대상균에 특이적으로 반응하는 생물학적 수용체(bio-recognition element)와 이들의 결합을 특정한 신호로 변환하여 전달하는 변환기(transducer)로 구성되어 있다(8-10). 따라서, *Shigella* spp.를 대상으로 한 바이오센서 검출법을 개발하기 위해서는 새로운 생물학적 수용체 탐색에 관한 연구가 선행되어야 한다.

박테리오파지는 숙주 세포를 선별적으로 사멸시키는 세균 바이러스로 전 세계에  $10^{30}$ - $10^{31}$ 개 존재하고 있으며(13-14), 높은 특이성뿐만 아니라 온도, pH, 유기용매 등에 대한 높은 안정성, 그리고 특이적인 미생물과의 결합력으로 인해 새로운 생물학적 수용체로 각광받고 있는 실정이다(8,13-16). 따라서, 환경(토양, 온천, 하수 등)이나 식품(신선 식품, 돼지고기, 닭고기, 파이, 비스킷, 치즈, 요거트, 홍합, 굴 등)으로부터 다양한 종류의 박테리오파지를 분리하고 있으며, 이를 활용하기 위한 연구가 진행 중이다(12,16). 또한, 미국 FDA는 박테리오파지를 새로운 식품첨가물(Generally Recognized As Safe)로 인정하여 식중독균의 저감화를 위한 “biocontrol agent”로서 이를 식품에 활용하고 있다(16-17). 본 연구에서는 박테리오파지 기반 신속검출법 개발을 위한 선행연구로 도축장 폐수 샘플로부터 *S. sonnei*에 특이적인 박테리오파지를 분리·정제하여 형태학적 특성을 규명한 후 생물학적 수용체로서의 적용을 검토하기 위해 다양한 균들을 대상으로 하여 그 특이성과 적용을 위한 안정성을 검토하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양조건

실험에 사용한 균주(Table 1)는 American Type Culture Collection(ATCC), International Vaccine Institute(IVI), Bio-Resource Management for Pathogens National Culture

**Table 1. Specificity of *Shigella sonnei*-specific bacteriophage against food-associated microorganisms**

| Bacterial strain                           | Plaque formation <sup>1)</sup> | Source <sup>2)</sup> |
|--------------------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| <i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290           | +                              | ATCC                 |
| <i>Shigella boydii</i> NCCP 11190          | -                              | NCCP                 |
| <i>Shigella flexneri</i> 2a strain 2457T   | -                              | IVI                  |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966      | -                              | ATCC                 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> JUNAH          | -                              | VMRI                 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> SNUFPC-A3      | -                              | VMRI                 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> SNUFPC-A5      | -                              | VMRI                 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> SNUFPC-A6      | -                              | VMRI                 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> SNUFPC-A7      | -                              | VMRI                 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> SNUFPC-A8      | -                              | VMRI                 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> SNUFPC-A9      | -                              | VMRI                 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> SNUFPC-A10     | -                              | VMRI                 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> SNUFPC-A11     | -                              | VMRI                 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061          | -                              | ATCC                 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579          | -                              | ATCC                 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633         | -                              | ATCC                 |
| <i>Campylobacter jejuni</i>                | -                              | DPFS                 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 15144         | -                              | ATCC                 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC BAA 2192      | -                              | ATCC                 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC BAA 2196      | -                              | ATCC                 |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895 | -                              | ATCC                 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883    | -                              | ATCC                 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19116   | -                              | ATCC                 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644    | -                              | ATCC                 |
| <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090         | -                              | ATCC                 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027    | -                              | ATCC                 |
| <i>Salmonella</i> Dublin                   | -                              | DPFS                 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076   | -                              | ATCC                 |
| <i>Salmonella</i> Hartford                 | -                              | DPFS                 |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg               | -                              | DPFS                 |
| <i>Salmonella</i> Mission                  | -                              | DPFS                 |
| <i>Salmonella</i> Montevideo               | -                              | DPFS                 |
| <i>Salmonella</i> Newport                  | -                              | DPFS                 |
| <i>Salmonella</i> Panama                   | -                              | DPFS                 |
| <i>Salmonella</i> Salamae                  | -                              | DPFS                 |
| <i>Salmonella</i> Senftenberg              | -                              | DPFS                 |
| <i>Salmonella</i> Typhi                    | -                              | DPFS                 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311   | -                              | ATCC                 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 15812   | -                              | ATCC                 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923    | -                              | ATCC                 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802  | -                              | ATCC                 |
| <i>Vibrio vulnificus</i>                   | -                              | DPFS                 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715  | -                              | ATCC                 |

<sup>1)</sup>+, clear plaque; -, no susceptibility to *Shigella sonnei*-specific bacteriophage.

<sup>2)</sup>ATCC, American Type Culture Collection; IVI, International Vaccine Institute; NCCP, Bio-Resource Management for Pathogens National Culture Collection for Pathogens; DPFS, Department of Plant and Food Sciences, Sangmyung University; VMRI, College of Veterinary Medicine and Research Institute for Veterinary Science, Seoul National University.

Collection for Pathogens(NCCP), Department of Plant and Food Sciences(DPFS), College of Veterinary Medicine and Research Institute for Veterinary Science, Seoul National University(VMRI)에서 구입 혹은 제공 받아 사용하였다. 각각의 균주 배양을 위해 tryptic soy broth(TSB, Difco Laboratories Inc., Sparks, MD, USA)를 사용하여 37°C에서 110 rpm, 16시간 동안 배양하였다. 원심분리(6,000 rpm, 5분) 후, 균체에 1 mL의 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4, Life technologies Co., Paisley, UK)를 첨가하였다. 위 단계를 3번 반복하여 순수 균주를 확보하였다. 분광광도계(Optizen 2120UV, Mecasys Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하여 640 nm에서 균주 현탁액의 흡광도를 측정하고 작성된 표준곡선을 활용하여 각각의 농도를  $10^8$  CFU/mL로 하였다.

#### *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 분리·정제

영천 (주)삼세 도축장으로부터 채취한 2개의 도축 폐수 샘플 25 mL를 각각 TSB 225 mL와 1 mL의 *S. sonnei* ATCC 9290( $10^8$  CFU/mL)에 혼합하여 37°C에서 160 rpm, 16시간 동안 배양하였다. 원심분리(8,000 rpm, 10분)한 후 상층액을 0.20 µm cellulose acetate filter(Advantec Tokyo Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하였다. 200 µL의 *S. sonnei* ATCC 9290( $10^8$  CFU/mL)와 4 mL의 TA soft agar(4 g agar, 8 g nutrient broth, 5 g NaCl, 0.2 g MgSO<sub>4</sub>, 0.05 g MnSO<sub>4</sub>, 0.15 g CaCl<sub>2</sub>/L)를 혼합하여 TSB 고형 배지(TSA, Difco Laboratories Inc., Sparks, MD, USA)에 부어 굳힌 후, 여과된 박테리오파지 10 µL를 TSB 고형배지 4곳에 분주하였다(dot assay). 희석한 박테리오파지 여과액 100 µL와 200 µL의 *S. sonnei* ATCC 9290( $10^8$  CFU/mL)를 4 mL의 TA soft agar에 혼합하여 TSB 고형배지에 부어 굳힌 후, 37°C에서 16시간 동안 배양하였다(plaque assay). 단일 plaque를 취하여 sodium chloride-magnesium sulphate buffer(SM buffer, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.5)에 1시간 동안 실온에서 교반하였다. 위 단계를 2번 반복하여 단일 박테리오파지를 분리하였다. 분리된 단일 박테리오파지의 증식을 위해 3 mL의 TA broth에 1% *S. sonnei* ATCC 9290( $10^8$  CFU/mL)를 혼합하여 37°C에서 190 rpm, 2시간 동안 배양하였다. 배양 후, 혼합액을 원심분리(6,000 rpm, 10분)한 후 상층액을 0.20 µm cellulose acetate filter로 여과하였다. 위 단계를 TA broth 양을 증가하면서 반복한 후 최종적으로 여과된 박테리오파지는 10%(w/v) polyethylene glycol과 1 M NaCl 용액을 혼합하여 4°C에서 16시간 동안 정지시킨 후 원심분리(8,000 rpm, 20분) 하였다. SM buffer로 pellet을 현탁한 후, CsCl 밀도 구배 초원심분리(22,000 rpm, 2시간)를 실시하였다. 생성된 박테리오파지 band를 회수하여 냉장 온도에서 6시간 동안 투석하였다. 정제된 박테리오파지의 최종 농도는 plaque assay로 확인하였다.

#### *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 형태학적 특성 분석

분리·정제된 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지 10 µL를 carbon-coated copper grid에 올려 4%의 phosphotungstic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 염색한 후 Transmission electron microscope(TEM, H-7100, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)으로 형태학적 특성을 관찰하였다.

#### *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 DNA 분리 및 크기 분석

정제된 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 genomic DNA(gDNA)를 NORGEN<sup>®</sup> bacteriophage DNA isolation kit(Norgen Biotek Co., Thorold, ON, Canada)로 분리·정제하였고, 정제된 gDNA의 농도는 picodrop(Picodrop Ltd., Hinxton, UK)으로 측정하였다. 정제된 gDNA의 크기를 확인하기 위해 50 V에서 1.5시간 0.4% 아가로스 겔 전기영동(Takara Bio Ltd., Shiga, Japan)하였다. DNA ladder(GeneRuler High Range DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)로 gDNA 크기를 결정하였다.

#### *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 특이성 분석

분리·정제된 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 특이성 검토를 위해 28종의 식중독균을 각각 TSB에 배양한 후( $10^8$  CFU/mL) dot assay법을 이용한 clear zone 생성 여부로 감염 속주 여부를 확인하였다.

#### *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 pH 및 온도 안정성 검토

정제된 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지( $10^9$  PFU/mL) 100 µL와 다양한 pH 범위를 가진 TSB 900 µL(pH 3, 5, 7, 9, 11)를 혼합한 후 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 온도 안정성 검토를 위해 박테리오파지( $10^9$  PFU/mL) 100 µL와 SM buffer(pH 7.5) 900 µL를 혼합하여 다양한 온도(4, 22, 37, 45, 50°C)에 1시간 동안 반응시킨 후 배양하였다. 배양 후, plaque assay를 통해 역가를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

#### *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 분리·정제

영천 (주)삼세 도축장으로부터 수집된 도축 폐수 샘플에서 *S. sonnei* ATCC 9290에 대응하는 2개의 박테리오파지가 분리되었고, 분리된 두 개의 박테리오파지를 대상으로 dot assay를 수행한 결과 clear zone의 크기가 각각  $1.88 \pm 0.15$  cm,  $1.83 \pm 0.05$  cm로 확인되었다. 그 중 clear zone 크기가 크고 선명한( $1.88 \pm 0.15$  cm, Fig. 1A) 박테리오파지를 대상으로 plaque assay를 수행하여 단일의 박테리오파지를 분리하였고(Fig. 1B), 단일의 박테리오파지는 증식과정을 통해 최종적으로  $2.0 \times 10^{12}$  PFU/mL 농도로 정제되었다. 정제된

단일의 박테리오파지를 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지(*S. sonnei*-specific bacteriophage)로 명명하였다.

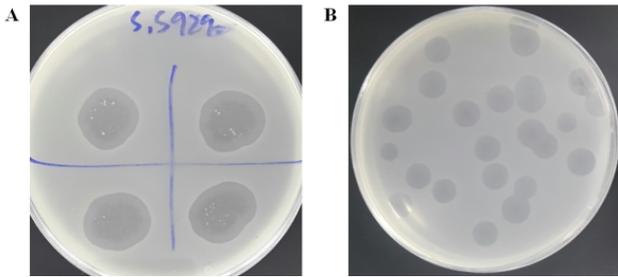


Fig. 1. Plaques formation of *S. sonnei*-specific bacteriophage using (A) dot assay and (B) plaque assay.

#### *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 형태학적 특성 분석

*S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 TEM 분석 결과(Fig. 2), 머리 너비와 길이는 각각  $69.9 \pm 11.2$  nm와  $77.5 \pm 8.8$  nm였으며, 꼬리 길이는  $264.4 \pm 33.9$  nm로 관찰되었다. 이십면체 머리와 비교적 긴 비수축성 꼬리를 가지고 있어, International Committee of Taxonomy of Viruses(ICTV)에서

제시한 분류방법에 따라 *Caudoviridae* 목의 *Siphoviridae*에 속함을 확인하였다(18). 기존의 연구결과에 의하면(Table 2), Jun 등(19)은 서울 홍제천 개울물로부터 *Myoviridae*로 분류되는 *S. sonnei*와 *S. flexneri*에 특이적인 한 개의 박테리오파지(pSs-1)를 분리하였고 머리 길이  $98 \pm 4$  nm, 꼬리 길이  $120 \pm 7$  nm로 보고하고 있다. 또한 Faruque 등(20)은 방글라데시 수도 다카의 강 2곳에서 71개의 강물 샘플로부터 *Podoviridae*로 분류되는 *S. dysenteriae* 특이적 박테리오파지(SF-9)를 분리하였고, 상당히 짧은 꼬리(TEM 이미지 분석 결과 5 nm로 추정)를 가짐을 확인하였다. 또한 Jun 등(21)은 서울 한강 물 샘플로부터 머리 길이와 꼬리 길이가 각각 73 nm와 103 nm인 *Siphoviridae*로 분류되는 *Shigella* spp. 특이적 박테리오파지 즉 pSf-1을 분리하였고, Strauch 등(22)은 설사 환자의 분변으로부터 머리 길이와 꼬리 길이가 약 65 nm와 약 26 nm로 상당히 짧은 꼬리를 가진 *S. sonnei* CB7888 특이적 박테리오파지를 분리하여 이를 *Podoviridae*로 분류하였다. 또한 Kim 등(23)은 *Myoviridae*로 분류되는 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지(SP18)를 분리하였고, 머리 길이 110 nm, 꼬리 길이 50-110 nm로 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서 분리된 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지는 기존

Table 2. *Shigella* spp. specific bacteriophages reported in scientific research articles

| Phage name                               | Classification      | Morphology  |             | Stability |            | DNA size (kb) | References |
|------------------------------------------|---------------------|-------------|-------------|-----------|------------|---------------|------------|
|                                          |                     | Head length | Tail length | pH        | Temp. (°C) |               |            |
| <i>S. sonnei</i> -specific bacteriophage | <i>Siphoviridae</i> | 77.5 nm     | 264.4 nm    | 3-11      | 4-37       | 25            | This study |
| pSs-1                                    | <i>Myoviridae</i>   | 98 nm       | 120 nm      | -         | -          | 160-250       | (19)       |
| SF-9                                     | <i>Podoviridae</i>  | -           | -           | 6-9       | 4-37       | 41            | (20)       |
| pSf-1                                    | <i>Siphoviridae</i> | 73 nm       | 103 nm      | 5-9       | 4-50       | 51            | (21)       |
| 7888                                     | <i>Podoviridae</i>  | 65 nm       | 26 nm       | -         | -          | 63.4          | (22)       |
| SP18                                     | <i>Myoviridae</i>   | 110 nm      | 50-110 nm   | -         | -          | 170           | (23)       |
| HY01                                     | <i>Myoviridae</i>   | 100 nm      | 100 nm      | 4-11      | -20-65     | 167           | (24)       |

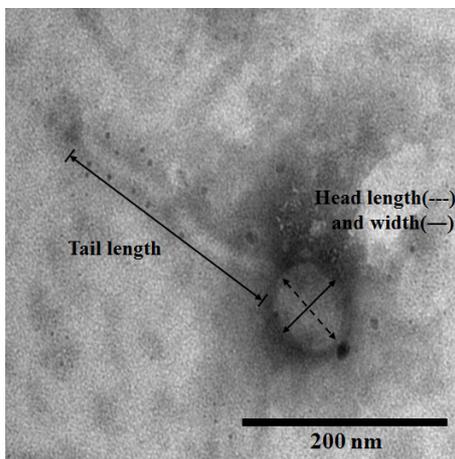


Fig. 2. TEM image of *S. sonnei*-specific bacteriophage with magnification of 50,000 $\times$ .

의 연구된 다수의 연구들과는 달리 *Siphoviridae*에 속하며 특히 꼬리의 길이가 *Siphoviridae*로 분류되는 pSf-1보다 거의 두 배 정도 길다는 점에서 기존에 보고된 *Shigella* spp. 특이적 박테리오파지와는 다른 형태학적 특성을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.

#### *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 DNA 분리 및 크기 분석

앞의 실험방법으로 분리된 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지를 0.4% 아가로스 겔로 전기영동 한 결과, 2.5 kb ladder를 size marker로 이용하여 약 25 kb DNA 크기의 band를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 기존의 연구결과와 비교해 보면, *S. sonnei* 특이적 박테리오파지는 약 41 kb 크기인 *S. dysenteriae* 특이적 박테리오파지(SF-9)(20)와 약 51 kb 크기의 *Shigella* spp. 특이적 박테리오파지(pSf-1)(21), 그리고

약 63 kb 크기의 *S. sonnei* CB7888 특이적 박테리오파지와 비교적 비슷한 크기의 DNA를 갖고 있음을 확인 할 수 있었다. 이에 비해 약 160-250 kb 크기의 *Shigella* spp. 특이적 박테리오파지(pSs-1)(19), 약 167 kb 크기의 *S. flexneri*와 *Escherichia coli* O157:H7 특이적 박테리오파지(HY01)(24), 그리고 약 170 kb 크기의 *S. sonnei*에 특이적 박테리오파지(SP18)(25)보다는 그 크기가 훨씬 작음을 알 수 있었다. 유전자의 크기는 일반적으로 박테리오파지의 분류학상 특성과 상관관계가 있으며, 일반적으로 *Siphoviridae*과에 속하는 박테리오파지의 DNA 크기가 35-70 kb 임을 감안한다면 (13), *S. sonnei* 특이적 박테리오파지는 상당히 작은 크기의 DNA를 함유하고 있음을 확인 할 수 있었고 이는 추가적인 유전자 염기서열 분석을 통해 박테리오파지의 신규성과 그 크기를 검증할 계획이다.

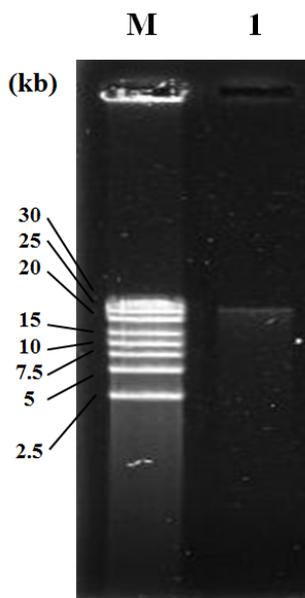


Fig. 3. Genomic DNA of *S. sonnei*-specific bacteriophage using 0.4% agarose gel electrophoresis.

Lane M, 2.5 kb ladder; Lane 1, *S. sonnei*-specific bacteriophage.

#### *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 특이성 분석

생물학적 수용체로서 요건을 검토하기 위해 43종의 균을 대상으로 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 특이성 검토 결과, *S. sonnei* 특이적 박테리오파지는 *S. sonnei* ATCC 9290에만 특이적으로 반응하여 1.88±0.15 cm 크기의 plaque를 형성하였다(Table 1). 하지만, 10종의 *Aeromonas hydrophila*, 2종의 *Bacillus cereus*, 1종의 *Bacillus subtilis*, 1종의 *Campylobacter jejuni*, 4종의 *Escherichia coli*, 1종의 *Klebsiella pneumoniae*, 3종의 *Listeria* spp., 1종의 *Pseudomonas aeruginosa*, 13종의 *Salmonella* spp., 1종의 *Staphylococcus aureus*, 2종의 *Vibrio* spp., 1종의 *Yersinia enterocolitica*에서는 plaque를 형성하지 않았다. 또한,

*Shigella* spp.의 다른 종 즉 *S. boydii* NCCP 11190, *S. flexneri* 2a strain 2457T에 대해 특이성을 나타내지 않았다. Jun 등 (19)은 특이성 분석을 위해 9개의 *Shigella* spp.(4종의 *S. sonnei*, 3종의 *S. flexneri*, 2종의 *S. boydii*)를 대상으로 그 중에서 4종의 *S. sonnei*와 3종의 *S. flexneri*에 특이적인 박테리오파지를 분리하였다고 기술하였으나 이들 연구는 9종의 *Shigella* spp.만 제한적으로 사용하였으므로 그 한계를 가지고 있다. 따라서 본 연구에서 분리·정제된 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지는 기존에 보고된 *Shigella* spp.에 특이적 박테리오파지보다 더욱 우수한 특이성을 갖는 박테리오파지임을 확인할 수 있었다.

#### *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 pH 및 온도 안정성

생물학적 수용체로서 센서에 적용되는 박테리오파지는 다양한 환경에 노출되므로 정제된 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 pH 및 온도 안정성은 무엇보다 중요한 특성 중의 하나이다(10). 따라서 본 연구에서 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지를 다양한 pH(Fig. 4)와 온도(Fig. 5) 범위에 노출시켜 그 안정성을 검토하였다. Fig. 4에서 보듯이, *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 농도는 pH 3, 5, 7, 9 그리고 11에서 6.87±0.62 log PFU/mL, 5.94±0.54 log PFU/mL, 5.86±0.66 log PFU/mL, 6.93±0.73 log PFU/mL, 그리고 5.76±0.57 log PFU/mL로 각각 확인되었다. *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 농도는 pH 3과 pH 9에서 비교적 높게 확인되었으나, 전 범위(pH 3-11)에 걸쳐 유의적인 농도변화는 확인되지 않았다( $p > 0.05$ ). Faruque 등(20)은 *S. dysenteriae* 특이적 박테리오파지(SF-9)의 pH 안정성 검토 결과 pH 6-9에서 안정함을 보여주었고, Lee 등(24)은 *S. flexneri*와 *Escherichia coli* O157:H7 특이적 박테리오파지(HY01)가 pH 4-11 범위에서 안정함을 보여주었다. 이에 비해 Jun 등(21)은 *Shigella* spp. 특이적 박테리오파지(pSf-1)가 pH 5-9에서 안정하였으나, pH 3과 pH 11에서는 그 농도가 거의 100% 감소함을 보여주었다. 따라서, *S. sonnei* 특이적 박테리오파지는 기존의 연구

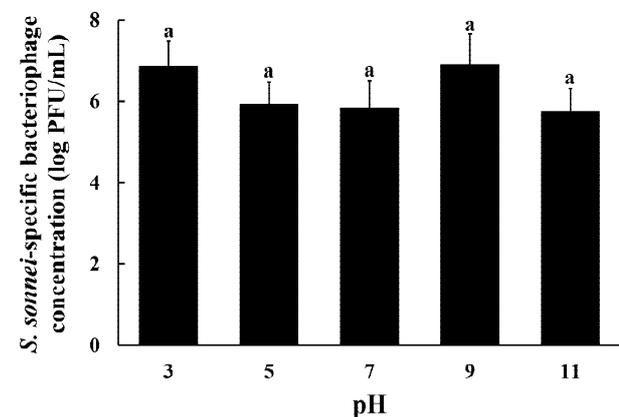


Fig. 4. pH stability of *S. sonnei*-specific bacteriophage.

된 다른 *Shigella* spp. 특이적 박테리오파지보다 넓은 범위에서 우수한 안정성을 보여 주었다.

또한, 온도에 대한 안정성 검토 결과, 4-37°C 범위에서는 안정적이었으나, 45°C에서는 그 농도가  $4.25 \pm 0.20$  log PFU/mL로 40% 이상 유의적으로 감소하였으며, 50°C에서는  $0.10 \pm 0.00$  log PFU/mL로 거의 98% 이상 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다( $p < 0.05$ ). 본 연구의 결과는 *Shigella* spp. 특이적 박테리오파지(pSf-1)가 4°C, 20°C, 그리고 25°C에서는 안정적이었으나 30°C부터 그 농도가 유의적으로 감소하기 시작하여 65°C에서는 거의 100% 감소한다는 Jun 등(21)의 결과보다 높은 온도 안정성을 보여 주었다. 또한, *S. dysenteriae* 특이적 박테리오파지(SF-9)를 대상으로 한 실험결과 4-37°C에서는 안정함을 보여준 반면, 45°C에서 농도가 유의적으로 감소한다는 유사한 실험결과를 보여 주었다(20). 따라서, *S. sonnei* 특이적 박테리오파지는 비교적 넓은 범위의 pH와 온도에 안정함을 확인할 수 있었고, 새로운 생물학적 수용체로서 광범위한 pH와 온도를 갖는 다양한 식품에 적용 가능성을 잠재적으로 보여주었다.

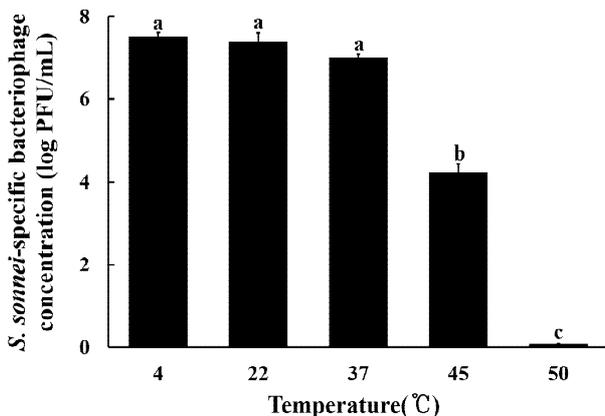


Fig. 5. Temperature stability of *S. sonnei*-specific bacteriophage. The letters (a-c) indicate significantly different means among the group at  $p < 0.05$ .

## 요 약

본 연구에서는 영천 (주)삼세 도축장 폐수 샘플에서 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지를 분리·정제한 후 생물학적 수용체로서의 특성을 검토하였다. Plaque assay를 통해 정제된 박테리오파지의 최종농도는  $2.0 \times 10^{12}$  PFU/mL로 확인되었고, *S. sonnei* 특이적 박테리오파지로 명명하였다. TEM 결과 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지는 비수축성의 비교적 긴 꼬리( $264.4 \pm 33.9$  nm)와 이십면체의 머리로 이루어져 있었으며, 머리 너비와 길이는 각각  $69.9 \pm 11.2$  nm와  $77.5 \pm 8.8$  nm로 *Siphoviridae*과에 속함을 확인하였다. 0.4% 아가로스

겔 전기영동 결과 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 DNA 크기는 약 25 kb였으며, 특이성 검토 결과, *S. boydii*, *S. flexneri*를 포함한 42개의 균에는 반응하지 않고 *S. sonnei*에만 특이적으로 반응하여 plaque를 형성하였다. *S. sonnei* 특이적 박테리오파지의 pH 및 온도 안정성 검토 결과 pH 3-11 그리고 4-37°C에서 모두 높은 안정성을 보여 주었으므로 *S. sonnei* 특이적 박테리오파지는 신규의 생물학적 수용체로서 *S. sonnei*를 검출할 수 있는 신속검출법 개발에 활용될 수 있는 충분한 잠재성을 보여주었다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 과제(PJ012290)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

- Soffer N, Woolston J, Li M, Das C, Sulakvelidze A (2017) Bacteriophage preparation lytic for *Shigella* significantly reduces *Shigella sonnei* contamination in various foods. PLoS One, 12, e0175256
- Park MK, Park JW, Wikle HC, Chin BA (2013) Evaluation of phage-based magnetoelastic biosensors for direct detection of *Salmonella* Typhimurium on spinach leaves. Sens Actuators B, 176, 1134-1140
- Petrovski S, Dyson ZA, Seviour RJ, Tillett D (2012) Small but sufficient: The *Rhodococcus* phage RRH1 has the smallest known *Siphoviridae* genome at 14.2 kilobases. J Virol, 86, 358-363
- Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM (1999) Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull W H O, 77, 651-666
- Ahmed AM, Shimamoto T (2015) Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* spp. of food origin. Int J Food Microbiol, 194, 78-82
- Zafar A, Sabir N, Bhutta ZA (2005) Frequency of isolation of *Shigella* serogroups/serotypes and their antimicrobial susceptibility pattern in children from slum areas in Karachi. J Pak Med Assoc, 55, 184-188
- Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/shigella> (accessed March 2015)
- Park MK, Oh JH (2012) Rapid detection of *E. coli* O157:H7 on turnip greens using a modified gold

- biosensor combined with light microscopic imaging system. Food Sci, 77, M127-M134
9. Hiremath N, Guntupalli R, Vodyanoy V, Chin BA, Park MK (2015) Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using novel lytic phage-based magnetoelastic biosensors. Sens Actuators B, 210, 129-136
  10. Byeon HM, Vodyanoy VJ, Oh JH, Kwon JH, Park MK (2015) Lytic phage-based magnetoelastic biosensors for on-site detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on spinach leaves. J Electrochem Soc, 162, B230-B235
  11. Hiremath N, Chin BA, Park MK (2017) Effect of competing foodborne pathogens on the selectivity and binding kinetics of a lytic phage for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection. J Electrochem Soc, 164, B142-B146
  12. Choi IY, Park JH, Gwak KM, Kim KP, Oh JH, Park MK (2018) Studies on lytic, tailed *Bacillus cereus*-specific bacteriophage for use in a ferromagnetoelastic biosensor as a novel recognition element. J Microbiol Biotechnol, 28, 87-94
  13. Singh A, Arutyunov D, Szymanski CM, Evoy S (2012) Bacteriophage based probes for pathogen detection. Analyst, 137, 3405-3421
  14. Verma V, Harjai K, Chhibber S (2009) Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: A potential therapeutic agent. Curr Microbiol, 59, 274-281
  15. Choi IY, Lee JH, Kim HJ, Park MK (2017) Isolation and characterization of a novel broad-host-range bacteriophage infecting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for biocontrol and rapid detection. J Microbiol Biotechnol, 27, 2151-2155
  16. Oh JH, Park MK (2017) Recent trends in *Salmonella* Outbreaks and emerging technology for biocontrol of *Salmonella* using phages in foods: a review. J Microbiol Biotechnol, 27, 2075-2088
  17. Yang H, Liang L, Lin S, Jia S (2010) Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol, 10, 131-140
  18. Ackermann HW, DuBow MS, Gershman M, Karska-Wysocki B, Kasatiya SS, Loessner MJ, Mamet-Bratley MD, Regue M (1997) Taxonomic changes in tailed phages of enterobacteria. Arch Virol, 142, 1381-1390
  19. Jun JW, Giri SS, Kim HJ, Yun SK, Chi C, Chai JY, Lee BC, Park SC (2016) Bacteriophage application to control the contaminated water with *Shigella*. Sci Rep, 6, 22636
  20. Faruque SM, Chowdhury N, Khan R, Hasan MR, Nahar J, Islam MJ, Yamasaki S, Ghosh AN, Nair GB, Sack DA (2003) *Shigella dysenteriae* type 1-specific bacteriophage from environmental waters in Bangladesh. Appl Environ Microbiol, 69, 7028-7031
  21. Jun JW, Kim JH, Shin SP, Han JE, Chai JY, Park SC (2013) Characterization and complete genome sequence of the *Shigella* bacteriophage pSf-1. Res Microbiol, 164, 979-986
  22. Strauch E, Lurz R, Beutin L (2001) Characterization of a shiga toxin-encoding temperate bacteriophage of *Shigella sonnei*. Infect Immun, 69, 7588-7595
  23. Kim KH, Chang HW, Nam YD, Roh SW, Bae JW (2010) Phenotypic characterization and genomic analysis of the *Shigella sonnei* bacteriophage SP18. J Microbiol, 48, 213-222
  24. Lee HY, Ku HJ, Lee DH, Kim YT, Shin HD, Ryu SY, Lee JH (2016) Characterization and genomic study of the novel bacteriophage HY01 infecting both *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri* potential as a biocontrol agent in food. PLoS One, 11, e0168985