J. Fd Hyg. Safety 9(3), 141-149(1994)

남해안연안에 분포되어 있는 *Vibrio parahaemolyticus*의 성상 및 Grapefruit Seed Extract 처리에 의한 항균효과

강동훈 · 전상수 · 정덕화* · 조성환*†

경상남도 보건환경연구원, *경상대학교 식품공학과

Antimicrobial Effect of Grapefruit Seed Extract on *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from the Southern Adjacent Sea of Korea

Dong-Hoon Kang, Sang-Soo Chun, Duck-Hwa Chung* and Sung-Hwan Cho*†

*Gyeongsangnamdo Provincial Government Institute of Health and Environment, Changwon 641-241, Korea and *Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*

ABSTRACT—To investigate the distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the southern 4 coastal areas, *Vibrio parahaemolyticus* was isolated from seawater, shellfish and sediment from May to October in 1991, and antimicrobial effect of grapefruit seed extract (GFSE) on the growth of isolated strains were examined. In the 120 samples from 4 coastal areas, 16 strains of *Vibrio parahaemolyticus* were isolated and identified. The distribution serotype of isolated strains was 10 types of monovalent k-antiserum. Especially k-5 and k-28 were highly distributed with 3 and 4 strains. 31.3% of isolated strains showed positive on Kanagawa phenomenon test. All isolated *Vibrio parahaemolyticus* were sensitive to chloramphenicol and gentamycin, 5 and 6 strains were resistant to streptomycin and colistin, respectively. Isolated strains were compared with geographical, month and sample. The distribution of 16 isolated *Vibrio parahaemolyticus* was high at Hadong with 50%(8 strains), on July with 43.8%(7 strains) and from seawater with 37.5%(6 strains) respectively. Minimal inhibitory level of GFSE to *Vibrio parahaemolyticus* was 50 ppm. With 100 ppm treatment of GFSE, the destroy of cell membrane function, outflow of cell ingredients and ghost morphology of cell were investigated.

Keywords □ *Vibrio parahaemolyticus*, serotype, grapefruit seed extract, antimicrobial effect

*Vibrio parahaemolyticus*는 장염환자의 분변에서 뿐만 아니라 해수, 어패류, 어류 가공식품 등에서도 분리되었으며,[1] 그 후 아시아지역을 비롯하여 미국, 서독, 영국, 하와이 등에서도 분리 보고 된 바 있다.[2-5] 우리나라에서도 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 논문이 많으며,[6-9] 특히 어패류 및 해산물의 생산이 많은 남해안 일대와 유명한 해수욕장과 관광지를 중심으로 생선회에 의한 *Vibrio parahaemolyticus* 식중독이 많이 보고되고 있다.[7] 대체로 식중독 환자에서 분리된 *Vibrio parahaemolyticus*는 장염을 일으키는 병원성을 갖고 있음이 보고되었으나,[10] 실제 자연계에 서식하고 있는 *Vibrio parahaemolyticus*는 균 자체가 식중독을 유발시키는 병원성을 갖고 있는지를 밝힌다는 것은 매우 어려우므로 용혈현상, 세포독성, 항원성 등의 생물 및 물리화학적 성상의 특징을 조사하여 병원성 유무를 결정하는 경향이다.[8] 한편, *Vibrio parahaemolyticus*를 비롯한 세균에 의한 식중독 예방을 위해 세균 증식의 억제와 살균효과를 나타내는 천연항균제를 개발할려는 연구가 진행되고 있으며, 천연추출물인 GFSE에 의한 실험이 그 대표적인

† To whom correspondence should be addressed.

예[11-13]로, GFSE는 gram 양성균과 gram 음성균 및 곰팡이 등의 폭넓은 범위에 신속하고 효과높은 살균력을 가지고 있으며,[14] 인체에 무해하고 산패를 방지하는 성질을 갖고 있다고 알려져 있다.[13] 본 연구에서는 *Vibrio parahaemolyticus*에 의한 식중독 예방의 일환으로 남해안 4개 지역에서 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포상태를 조사하고, 아울러 분리균에 대한 생물학적 특성을 시험하였으며, *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 GFSE 항균효과를 실험하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료채취

본 실험에서 *Vibrio parahaemolyticus*의 분포조사를 위한 검체의 채취는 1991년 5월부터 10월까지 남해안의 거제, 충무, 삼천포 및 하동의 4개 지역을 선정하여 해수, 패류 및 갯벌을 대상으로 월 2회 지역별 및 시료별로 각각 10건의 검체를 채취하여 시험하였다.

*Vibrio parahaemolyticus*의 분리 및 동정

Vibrio parahaemolyticus 분리를 위해 채취한 검체중 해수는 연안 4개 지역에서 멸균병에 1 L를 채취하여 냉장상태로 실험실에 운반하여 Millipore filter system (pore size 0.45 m)로 여과한 여과지를 3% NaCl alkaline peptone water (3% NaCl APW, pH 8.4) 100 m*l*에 넣고 35℃, 16~18 hrs 증균배양하였으며, 패류 및 갯벌은 멸균병에 100 g씩 채취하여 냉장상태로 실험실에 운반한 후 마쇄하여 해수의 시험방법과 같이 증균배양하였다. 증균배양 시킨 배양액으로부터 백금선을 사용하여 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose) Agar에 획선 도말한 후 35℃, 18~24 hrs 배양한 다음 sucrose를 분해하지 않는 전형적인 녹색집락을 선택하고, 감별배지인 KIA(Klingler Iron Agar)에 접종하여 35℃, 18~24 hrs. 배양한 후 K/A (Alkaline Slant/Acid butt)성상과 Gas(-), H_2S(-)인 *Vibrio*속 균을 분리하였다. 분리된 균은 API 20E kit (analytical profile index, France)를 사용하여 생화학적 특성을 조사하고 아울러 K 항원진단용혈청(Denka Seiken co.)으로 slide 응집반응[15]을 실시하여 생리식염수에 응집반응을 일으키는 것과 K 항원 혈청에 응집되지 않는것은 제외하여 최종 *Vibrio parahaemolyticus*로 동정하였다.

분리균의 특성시험

Kanagawa phenomenon 시험은 혈청학적 시험에서 확정된 분리균주만을 대상으로 Wagatsuma agar를 사용하여 Barrow & Miller의 방법[16]으로 행하였고, 분리균주에 대한 항생제 감수성 시험은 Muller Hinton agar를 사용하여 Kirby-Bauer방법[17]인 Disc 확산법으로 실시하였으며, 동시험에 사용한 0 항생제 Disc(Difco. Co.)는 cephalothin, chloramphenicol, carbenicillin, gentamycin, neomycin, colistin, streptomycin, tetracyclin, nalidixic acid 및 kanamycin 이었다. 분리된 *Vibrio parahaemolyticus*의 생물학적 특성시험은 온도, pH 및 염도에 대하여 조사하였고, 이때 사용된 균은 국립보건원에서 분양받은 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 27519와 본 실험에서 분리된 *Vibrio parahaemolyticus* K4 균주로서 3% NaCl Brain Heart Infusion broth (3% NaCl BHI broth)에 균주를 접종하여 정치배양하였고, 실험균주는 3% NaCl BHI agar에 매달 계대배양하여 냉장실(4~8℃)에 보관하고 실험이 시작되기 직전에 3% NaCl BHI broth에 접종하여 35℃ 16~18 hrs 배양하여 사용하였다. 먼저 최적 배양온도를 조사하기 위하여 공시균을 3% NaCl BHI broth(pH 8.4)에서 접종하고 5, 15, 25, 35, 40, 45℃ 및 50℃에서 배양하였고, pH는 35℃에서 3% NaCl BHI broth를 pH 3에서 pH 12로 조정하여 배양하면서 최적 pH를 조사하였다. 염도의 경우는 BHI Broth(pH 8.4)의 염농도를 0.5% 및 1%에서 12% 농도로 조정한 후 공시균을 접종하여 배양하면서 각각 배양물을 spectrophotometer로 660 nm에서 흡광도를 측정하여 최적 배양조건을 결정하였다.[18]

분리균의 분포조사

*Vibrio parahaemolyticus*로 분리, 동정된 16 균주에 대해 지역별, 검체별 및 월별 분포를 조사하고 아울러 검체가 채취된 4개 지역의 해수에 대한 온도, pH 및 염도를 측정하여 *Vibrio parahaemolyticus*의 분리와 해수의 이화학적 관계를 조사하였다.

*Vibrio parahaemolyticus*에 대한 GFSE의 항균성 시험

*Vibrio parahaemolyticus*에 대한 항균성 효과를 시험하기 위하여 조 등,[11] 최 등[12]이 사용한 방법에 따라 조제된 GFSE를 사용하였고, 공시균은 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 27519와 *Vibrio parahaemolyticus* K4 균주였다. 먼저 3% NaCl BHI broth agar에 보

존된 균을 사용직전에 3% NaCl BHI broth에 35℃에서 16~18시간 동안 배양하고, 배양액 1 ml를 GFSE가 0, 30, 50, 100, 200 ppm 및 500 ppm 농도로 함유된 용액 1 ml과 함께 3% NaCl BHI broth 8 ml에 동시에 접종하고 35℃에서 경시적으로(1~96 hrs.) 배양하면서 균성장율을 3% NaCl BHI agar에서 균수측정법(Colony count method)[42]으로 시험하였고, 3% NaCl BHI broth에서 육안적 관찰 및 pH변화를 측정하여 시험균주의 감수성 및 GFSE의 최소저해농도(minimal inhibitory concentration: MIC)를 측정하였다. 한편, 생선회용 수산물에 오염되어 독성물질을 생성하는 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 GFSE의 항균작용을 조사하기 위하여 전보[13]와 같은 전자현미경적 방법을 이용하여 GFSE 처리전 후의 균체세포 및 생리상태의 변화를 관찰하였다. 즉, 100 ppm 농도로 희석한 GFSE 용액에 처리한 *Vibrio parahaemolyticus*균 세포를 대조구와 비교, 검경하여 GFSE 용액이 *Vibrio parahaemolyticus*균 세포벽 구조 및 생리기능에 미치는 영향을 중심으로 그 항균효과를 조사하였다.

결과 및 고찰

*Vibrio parahaemolyticus*의 분리 및 동정

남해안 4개 지역을 중심으로 채취한 해수, 패류 및 갯벌을 검체로부터 *Vibrio parahaemolyticus*의 분리를 실시하였다. 즉, 실험방법과 같이 증균배지인 3% NaCl APW에 증균시킨 다음 분리배지인 TCBS agar에 획선 도말한 후 35℃에서 18~24시간 배양하고, sucrose를 분해하지 않는 녹색 colony를 선택하여 감별배지인 KIA에 접종하고 같은 조건으로 배양시켰다. 배양된 균 중에서 K/A 성상, gas(-) 및 H_2S(-)인 *Vibrio*속 균을 분리하였다. 분리된 균은 API 20E kit를 사용한 생화학적 특성과 혈청응집학적 반응에 의해 16 균주의 *Vibrio parahaemolyticus*를 최종적으로 동정하였다. 앞서의 API 20E kit에서 나타난 생화학적 특성으로 분리, 동정된 16 균주와 표준 *Vibrio parahaemolyticus*를 대상으로 비교한 결과는 Table 1과 같이 *Vibrio parahaemalyticus* 표준균주와 동일하게 반응된 것은 ONPG, ADH, LDC 및 OCD 등의 21항목 중 18개 항목으로 전형적인 *Vibrio parahaemalyticus*의 특성을 보였으나, kohns gelatin, amygdalin 및 arabinose는 16 분리균주 중 일부가 약간 다른 이용성을 보였다.

Table 1. Characteristics of biochemical reaction of the isolated *Vibrio parahaemolyticus*

Strains / Characteristics	standard *Vibrio parahaemolyticus* strain (1)	Isolated *Vibrio parahaemolyticus* strains (16)
ONPG (ortho-nitro-phenyl-galactoside)	−	−
ADH(arginine)	−	−
LDC(lysine)	+	+
ODC(ornithine)	+	+
CIT(sodium citrate)	−	−
H_2S(sodium thiosulphate)	−	−
URE(urea)	−	−
TDA(tryptophane)	−	−
IND(tryptophane)	+	+
VP(sodium pyruvate)	−	−
GEL(kohns gelatin)	−	±
GLU(glucose)	+	+
MAN(manitol)	+	+
IND(inositol)	−	−
SOR(sorbitol)	−	−
RHA(rhamnose)	−	−
SAC(sucrose)	−	−
MEL(melibiose)	−	−
AMY(amygdalin)	−	±
ARA(arabinose)	−	±
OX(on filter paper)	+	+

*( ): substrates.

또한 monovalent k-antiserum과 응집반응을 보여 최종적으로 *Vibrio parahaemolyticus*로 확정된 균은 16 균주였으며, 이들 16 균주를 혈청형으로 분류한 결과는 Table 3과 같다. 이 때 사용된 k-antiserum은 k_1~k_{71}까지 밝혀진 Denka Seiken Co.제품으로 Table 2에서 보는 바와 같이 k-monovalent antiserum으로 분류할 수 있는 형은 10 types이었으며 이들 중 k_{28}형이 4 균주로 가장 많았고, k_5형 3 및 k_{29}형이 2 균주였으며 그외 k_3, k_4, k_{32}, k_{34}, k_{51}, k_{59} 그리고 k_{63}형은 각각 1 균주였다.

한편, 손 등[8]도 우리나라 연안의 해수 및 어패류에서 분리한 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 혈청학적 분류에서 유형별로 163주, 34 types로 나누었고, 이 때 k_{15} 및 k_{30} 혈청형이 각각 15 균주로 가장 많이

Table 2. The serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the submitted samples

Monovalent K-antiserum	No. of isolated *Vibrio parahaemalyticus*			
	Seawaters	Shellfishes	Sediments	Total
K_3	–	–	1	1
K_4	–	1	–	1
K_5	–	–	1	3
K_{28}	3	1	–	4
K_{29}	–	1	1	2
K_{32}	1	–	–	1
K_{34}	–	–	1	1
K_{51}	1	–	–	1
K_{59}	–	–	1	1
K_{63}	1	–	–	1
Total	6	5	5	16

Table 3. Hemolytic reaction of the isolated *Vibrio parahaemolyticus* on Wagatsuma medium with human blood and goat blood

Strains	Human blood		Goat blood		Result	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Seawaters	2	4	–	6	2	4
Shellfishes	1	4	–	5	1	4
Sediments	2	3	–	5	2	3
Total	5 (31.3%)	11	–	16	5 (31.3%)	11

분포되어 있음을 보고하였는데 본 논문에서 나타난 혈청형과는 다소 상이한 혈청형의 분포를 보였다.

분리균의 특성

Kanagawa phenomenon 시험을 목적으로 분리된 *Vibrio parahaemolyticus* 16 균주에 대한 Human O type Blood 5%를 첨가한 Wagatsuma agar medium과 Goat blood에서의 용혈성 시험에 대한 결과는 Table 3과 같았다. Human blood에서는 5 균주(31.3%)가 양성으로 나타났고, 11 균주(68.7%)가 음성이었으며 Goat blood에서는 16 균주 모두가 용혈성이 없었다. 한편 양성인 5 균주를 분리된 검체별로 나타내면

Table 4. Antibiotics sensitive test of *Vibrio parahaemalyticus* strains

Susceptivility Antibiotics	Disc potency (mcg)	No. of *Vibrio parahaemalyticus*		
		Sensitive	Intermediate	Resistant
Chloramphenicol	30	16	–	–
Cephalothin	30	10	4	2
Carbenicillin	100	11	4	1
Gentamycin	10	16	–	–
Neomycin	30	8	8	–
Colistin	10	2	10	4
Streptomycin	10	1	10	5
Tetracyclin	30	15	1	–
Nalidixic acid	30	15	–	1
Kanamycin	5	5	11	–

해수에서 분리된 균주 중 2 균주가, Kanagawa phenomenon 시험에서 양성을 보였고, 패류에서는 1 균주 및 갯벌에서는 2 균주가 각각 양성을 보였다. 일반적으로 환자에서 분리된 균의 경우 Kanagawa phenomenon 시험결과 96%가 양성이었으며 환경에서 분리된 균은 1%가 양성이라고 알려져 있고,[19] Barker 등[20]은 실제 집단 발생중인 식중독 환자 설사에서 분리된 균주는 모두 양성이고, 해산물에서는 대부분 음성이었다고 하였다. 또한, 손 등[8]의 보고에서는 양성이 19.6%를 나타내었으며 주 등[20,22]의 보고에서는 51.5%와 66% 등으로 나타났다.

본 실험에서 분리된 *Vibrio parahaemolyticus* 균주에 대한 항생제 감수성 시험의 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 16 균주 중 chloramphenicol과 gentamycin에 모두 감수성을 보였으며, 내성을 보인 균주는 streptomycin 5 균주, colistin 4 균주, cephalothin 2 균주, carbenicillin 및 nalidixic acid가 각각 1 균주로 나타났다. 이러한 결과를 토대로 *Vibrio parahaemolyticus*로 인한 식중독환자의 발생시 환자에서 높은 감수성을 보인 항생제를 투여할 경우 바람직할 것으로 사료된다. 김 등[21]에 의하면 세균의 항생제에 대한 내성은 세균이 갖고 있는 plasmid에 그 내성 유전자가 있을 경우가 대부분으로 이 내성 유전자들은 transposition, insertional element, conjugate 등을 통해 동종 및 이종세균으로의 전달이 가능해지며 이러한 내성의 전달은 각종 항생제에 대한 내성 균주의 출현빈도를 증대시키는 것으로 보고한 바 있는데 이러한 해수 및 어패류에 오염된 균의 내성 획득은 육지로부터 각종

오염물질 등에 함유된 미분해 항생물질에 의하거나 내륙의 내성균주가 해양오염을 일으킨 경우로 보여진다.

분리된 *Vibrio parahaemalyticus*의 생물학적 특성을 검토하기 위해 최적배양온도, pH 및 염도를 조사한 결과는 Table 5와 같았다. 먼저 염도는 0.5%에서 10%까지는 균이 생육되었으나 11% 이상에서는 정지되었고, 2~4%에서 가장 높은 성장율을 보였다. 아울러 최적 pH와 최적온도는 각각 pH 7~.9와 35~40℃이었다. 이러한 결과는 Table 8에서와 같이 남해안 해수의 pH가 7.7~8.4이며 염도가 2.9~3.3임을 감안할 때 해수가 본 균의 증식에 적합한 pH와 염농도임을 알 수 있었다.

*Vibrio parahaemalyticus*의 분포

분리, 동정된 *Vibrio parahaemalyticus* 16 균주를 대상으로 검체를 채취한 지역별, 월별 및 검체종류별로 분포조사를 실시하였다. 먼저 지역별 및 검체종류별로 분리균의 분포사항은 Table 5와 같이 나타났다. 분리균의 지역별 분포는 하동의 경우 8건(26.7%)으로 가장 높았으며 충무 4건(13.3%), 삼천포와 거제는 각각 2건(6.7%)이였다.

검체 종류별 분포를 비교해 보면 해수에서 6건(15%), 패류와 갯벌은 각각 5건(12.5%)의 *Vibrio parahaemalyticus*가 분리되었으며 그 중 하동에서 채취한 해수와 갯벌에서 각각 10건 중 3건(30%)으로 가장 높은 분포를 보였으나, 대체로 검체 종류별 분포는 비슷하였다.

분리된 *Vibrio parahaemalyticus*의 분포를 월별로

Table 5. Distribution of *Vibrio parahaemalyticus* in the sampling station and type

Sample source	Seawaters		Shellfishes		Sediments		Total	
Areas	A	B	A	B	A	B	A	B
Goeje	10	–	10	2	10	–	30	2 (6.7%)
Chungmu	10	2	10	1	10	1	30	4 (13.3%)
Samchumpo	10	1	10	–	10	1	30	2 (6.7%)
Hodong	10	3	10	2	10	3	30	8 (26.7%)
Total	40	6 (15%)	40	5 (12.5%)	40	5 (12.5%)	120	16 (13.3%)

A: No. of Sample, B: No. of Isolate.

Table 7. Physical parameters selected seawaters in 4 areas

Area	Months / Physical parameter	MAY	JUN.	JUL.	AUG.	SEP.
Goeje	Temp. (℃)	18	23.5	25	23.5	23
	pH	8.1	8.2	7.8	8.2	8.3
	Salinity (%)	3.3	2.7	3.1	2.7	2.8
Chungmu	Temp. (℃)	18	25	27	24	23.5
	pH	8.1	7.8	7.7	8.0	8.3
	Salinity (%)	3.2	3.1	3.4	3.1	3.0
Samchunpo	Temp. (℃)	18.5	24	26	23.5	23
	pH	8.0	8.2	7.8	8.0	8.4
	Salinity (%)	3.3	3.1	3.4	3.1	3.0
Hadong	Temp. (℃)	18	23.5	24	25.5	24.5
	pH	8.0	8.2	7.5	8.0	8.4
	Salinity (%)	3.3	2.9	2.8	3.0	2.9
Total	Temp. (℃)	18.1	24	25.5	24.1	23.5
	pH	8.1	8.1	7.7	8.1	8.4
	Salinity (%)	3.3	2.9	3.0	3.0	3.0

Table 6. Distribution of *Vibrio parahaemalyticus* for the monthly-sampled types

Months / Sample source	May		Jun.		Jul.		Aug.		Sep.		Tota	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Seawaters	8	1	8	2	8	3	8	–	8	–	40	6 (15)
Shellfishes	8	–	8	1	8	2	8	2	8	–	40	5 (12.5)
Sediments	8	–	8	–	8	2	8	2	8	1	40	5 (12.5)
Total	24	1 (4.2)	24	3 (12.5)	24	7 (29.2)	24	4 (16.7)	24	1 (4.2)	120	16 (13.3)

A: No. of Sample, B: No. of Isolate, ( ): %.

비교해 본 결과는 Table 6에서와 같이 5월부터 9월까지의 조사기간 중 7월의 경우 24건의 검체에서 7건(29.2%)의 *Vibrio parahaemalyticus*가 분리되어 가장 높은 분포를 보였으며, 8월은 4건(16.7%), 6월은 3건(12.5%), 5월과 9월은 각각 1건(4.2%)의 *Vibrio parahaemalyticus*가 분리되었으며, 특히 7월에 채취한 해수에서 8건에서 3건(37.5%)의 *Vibrio parahaemalyticus*가 분리되어 가장 높은 분포율을 보였다.

한편, 본 실험에서 사용한 검체를 채취한 해수의 환경인자를 참고로 조사한 결과 Table 7에서와 같이 대체로 해수의 pH와 염도는 비슷한 반면 해수의 온도가 7월의 경우 24~27℃로 높게 나타났는데, 이 결과로 *Vibrio parahaemolyticus*의 분리 결과와 비교했으며 대체로 해수의 온도가 높을 경우 *Vibrio parahaemolyticus*가 많이 분리되는 것으로 나타났다.

Baross[22]도 주변 온도가 10℃ 상승함에 따라 *Vibrio parahaemolyticus*는 2 log 단위 만큼의 균체수 증가를 보여 본 실험과 일치된 보고를 한 바 있다.

*Vibrio parahaemalyticus*에 대한 GFSE 항균효과

본 실험의 분포조사에서 16 균주의 *Vibrio parahaemalyticus*가 분리, 동정된 외에도, 김 등,[6] 주 등,[7] 손 등,[8] 이 등,[9] 장 등[23]도 *Vibrio parahaemolyticus*를 분리, 동정하여 보고한 것으로 한국 연안에 *Vibrio parahaemalyticus*가 분포되어 있는 것을 예견할 수 있으며 실제 여름철 해수의 온도가 높을 때 *Vibrio parahaemalyticus* 식중독이 매년 발생하고 있다. 따라서 이들 *Vibrio parahaemalyticus*의 분포조사 이외에도 실제 이들 균이 식품에 오염되었을 경우 *Vibrio parahaemalyticus* 식중독을 예방, 치료할 수 있는 연구의 수행이 국민건강 보호차원에서 절실히 요청되고 있다. 본 실험에서도 이러한 목적으로 현재 천연 항균성 물질로 널리 알려진[14,24] GFSE를 이용하여 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 항균성 효과를 시험하였다. 즉, 표준균주인 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 27519와 분리균 *Vibrio parahaemolyticus* k4를 공시균으로 하여 3% NaCl BHI broth에서 16~18시간 배양한 후, 그 배양액 1 ml를 GFSE의 농도가 0, 30, 50 ppm이 되도록 첨가된 3% NaCl BHI broth에 접종하여 35℃에서 배양하면서 경시적으로 균의 성장을 비롯한 GFSE의 공시균에 대한 항균성 여부를 실험하였다. 우선 GFSE를 처리 후 공시균의 생육여부를 균수측정법으로 조사한 결과는 Fig. 1과 같이 공시균은 대조구(0 ppm)와 30 ppm GFSE 처리구에서는 균의 성장이 일정수준으로 유지되었으나, 50 ppm 농도 처리시에는 배양 3시간 후 완전히 공시균이 사멸되는 것으로 나타났다.

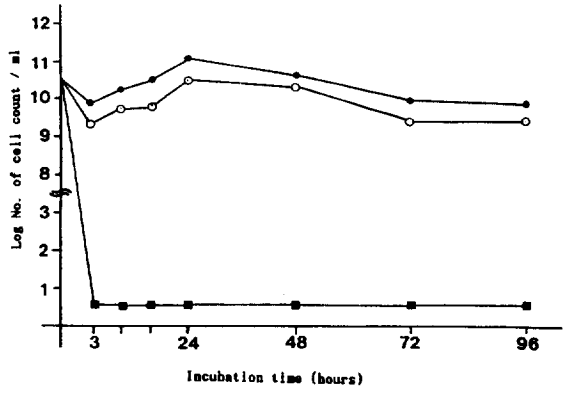

Fig. 1. Inhibitory effects of GFSE on the growth of *Vibrio parahaemalyticus*.
●-● control(0 ppm), ○-○: 30 ppm, ■-■: 50 ppm.

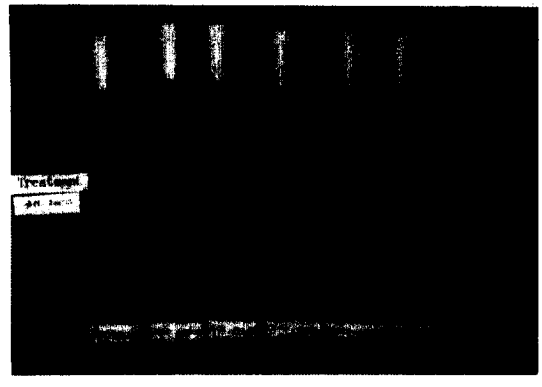

Fig. 2. Inhibitory effect of GFSE on the growth of *Vibrio parahaemalyticus* in 3% NaCl BHI broth.

최 등[12]도 일반세균에 대한 GFSE의 항균성을 조사하기 위해 nutrient broth에 GFSE의 농도를 0~1,000 ppm으로 조절하고, 균배양액을 접종하여 48시간 배양한 후 공시균의 증식유무를 관찰한 결과 *Vibrio parahaemalyticus*와 *Vibrio fluvialis*는 50 ppm에서, *Bacillus cereus* 및 *Staphylococcus aureus*는 30 ppm, 그리고 *Serratia*속은 10 ppm 이상의 GFSE 처리로 균의 증식이 억제된다고 보고하였는데, 이와 같이 실험결과와 상이한 것은 GFSE의 미생물에 대한 항

Fig. 3. Transmission electron micrographs of *Vibrio parahaemolyticus* (A: Control, B: Treated with GFSE) (magnification: ×17,000).

Fig. 4. Transmission electron micrographs of *Vibrio parahaemolyticus* (A: Control, B: Treated with GFSE) (magnification: ×26,000).

균력은 실험에 사용한 균종간에 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한 GFSE를 농도별로 처리한 3% NaCl BHI broth에 균을 접종하고 35℃, 48시간 배양 후 공시균의 생육정도를 시험관내에서 직접비교 확인한 결과 Fig. 2와 같이 50 ppm 이상에서는 완전히 균의 생육이 억제되어 고체배지에서의 균체측정 결과와 일치함을 나타내고 있다.

균의 성장과 아울러 GFSE를 처리한 후 공시균을 접종하여 배양한 배양액의 pH 변화를 경시적으로

Table 8. Change of pH on the concentration of GFSE in 3% NaCl BHI broth at 35°C

Hours \ GFSE conc. (ppm)	Control	30	50	100	200	500
3	7.11	7.27	7.51	7.64	7.52	7.41
6	7.23	7.31	7.51	7.71	7.58	7.41
12	7.45	7.51	7.50	7.72	7.60	7.43
24	7.82	7.72	7.55	7.73	7.61	7.43
48	8.11	7.92	7.54	7.60	7.62	7.45
72	8.21	8.03	7.49	7.57	7.42	7.50
96	8.57	8.33	7.45	7.55	7.34	7.52

조사한 결과는 Table 8와 같이 대조구와 30 ppm의 GFSE 처리구에서는 약간의 pH 상승을 보인 반면 50 ppm 이상농도의 GFSE 처리시에는 큰 변화가 없음을 보여주었다. 이러한 시험을 토대로 실제 GFSE와 같은 천연항균성 물질 개발이 매우 필요하며 이를 활용한 식중독예방 대책 수립이 절실한 실정이다.

한편, 해산물에서 분리한 *Vibrio parahaemalyticus* 균체세포를 100 ppm 농도의 GFSE 용액으로 처리한 것을 처리하지 않은 대조구 균주와 함께 전자현미경 촬영시료로 조제하여 촬영한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다. GFSE를 처리한 *Vibrio parahaemalyticus* 균체세포는 세포막의 기능이 파괴되어 세포내용물이 균체외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되며, 균체 내부가 빈 ghost 형태의 균체수가 증대함을 알 수 있었다. 이것은 GFSE가 미생물의 세포내 생리활성 효소의 기능을 약화시키고, DNA/RNA 유전정보 기작을 방해한다는 기존의 연구보고[24,25]로 미루어, 미생물의 세포벽 및 세포막의 기능이 상실되어 미생물 균체 내용물의 소실 등으로 인한 GFSE의 항균작용에 기인하는 것으로 생각된다.

국문요약

남해안 연안에 상존하는 식중독 원인균인 *Vibrio parahaemolyticus*균의 분포를 조사하기 위하여 1991년 5월부터 9월 중 남해안 4개 지역에서 해수, 패류 및 갯벌을 검체로 채취하여 *Vibrio parahaemolyticus*균을 분리, 동정하고 분리된 균에 대한 균학적 특성을 조사하하는 한편, grapefruit 종자추출액(GFSE)의 분리균에 대한 항균효과를 실험하였다. 실험결과, 남해안 4개 지역의

검체 120건에서 16균주(13.3%)의 *Vibrio parahaemolyticus*를 분리, 동정하였고 특히 분리균에 대한 혈청학적 분포는 모두 10 type으로 그 중 K_5 및 K_{28}형이 각각 3와 4 균주로 높은 분포를 보였으며, Kanagawa phenomenon시험에서는 5균주(31.3%)가 양성이고, 분리균은 항생제 중 chloramphenicol과 gentamycin에 대해서는 모두가 감수성을 보인 반면, streptomycin과 colistin에 대해서 5 및 6균주가 내성을 가지고 있었다. 분리균 16 균주를 대상으로 지역별, 월별, 검체별 분포상황을 조사한 결과 하동에서 8균주로서 가장 많이 분리되었고, 월별로는 7월에, 검체별로는 해수에서 6균주가 분리되어 가장 높은 분포율을 보였다. 한편, *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 GFSE처리별 최소억제농도는 50 ppm이었으며, 특히 100 ppm처리시 분리균의 세포막 기능의 파괴, 세포내용물의 균체 외부유출 및 균체내부의 ghost 형태가 관찰되었다.

참고문헌

1. Sakazaki, R., *et al.*: Studies on the enteropathogenic, facaltatively halophilic bacterium. *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological cultural and biological properties and its taxonomical position. *Jap. J. Mod. Sci. Biol.*, **16**, 161 (1963).
2. Sarker, B.L., Nair, G.B., Sircar, B.K. and Palo, S.C.: Incidence and level of *Vibrio parahaemolyticus* associated with freshwater plankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 288 (1983).
3. Vanden Broek, M.J.M., Mossel, D.A.A. and Eggenkamp Alie: Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in Dutch Mussels. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 438 (1797).
4. Molitoris, E., Joseph, S.W., Krichevsky, M.I., *et al.*: Characterization and Distribation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1388 (1985).
5. Charles, A.K., Carlos, A. Jr., Robert, F.S., *et al.*: Incidence of ureahydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* in willapa bay washington. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 904 (1990).
6. 김영만, 장동석: 부산연안의 *Vibrio parahaemolyticus* 분포에 관한 연구. 부산수산대보, **17**, 45 (1977).
7. 주진우: 한국남해안 일대의 해수, 해니, 및 각종 해산물에서 장염 비브리오균 분리 연구. 대한미생물학회지, **18**, 1 (1983).
8. 손준용, 이길웅, 유재창: 전염성 설사 질환에 대한 세균학적 조사연구. (2) 장염비브리오 및 NAG vibrio 분포에 관한 연구. 국립보건원보, **20**, 45 (1983).
9. 이길웅, 박만석, 주진우: 비브리오균속 질환의 세균학적 조사연구. 국립보건원보, **21**, 133 (1984).
10. Zen-Yoji, H., *et al.*: Epidemiology, enteropathogenicity and classification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Infec. Dis.*, **115**, 436 (1965).
11. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생: 수산물에 대한 grapefruit 종자추출물의 항균 및 항산화 효과. 한국수산학회지, **23**, 289 (1990).
12. 최종덕, 서일원, 조성환: Grapefruit 종자추출물의 항균성에 관한 연구. 한국수산학회지, **23**, 297 (1990).
13. 조성환, 서일원, 최종덕, 전상수, 라택균, 정수근, 강동훈: 천연항균성 물질을 이용한 *Vibrio vulnificus*의 살균 및 독소생성 억제효과. 한국식품위생학회지, **7**, 99 (1992).
14. Slavík, M.F.: Effectiveness of grapefruit seed extract in eliminating *Salmonella typhimarium* from chicken carcasses. The results of trials tested in the agricultural experiment station. Univ. of Arkanas (1988).
15. Sakazaki, R.: Recent trends of *Vibrio parahaemolyticus* as a causitive agent of food poisoning. *In the microbiological safety of food*. London, Academic Press (1973).
16. Barrow, G.I. and Miller, D.C.: *Vibrio parahaemolyticus* and seafood. *In Microbiology in agriculture, fisheries and food*. London, Academic Press (1976).
17. Kirby, W.M., Bauer, A.W., *et al.*: Antibiotic susceptibility testing by a standardizied single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **36**, 493 (1966).
18. 장동석, 신일식, 최승태, 김영만: *Vibrio parahaemolyticus*균의 분포 및 세균학적 특성. 한국수산학회지, **19**, 118 (1986).
19. Farmer, J.J. III, Hickman-Brenner, and kelly, M.T.: *Vibrio* manual of Clinical Microbiology 4th Edit, 282 (1985).
20. Barker, Jr., W.H. and Gangarosa, E.J.: Food poisoning duto *Vibrio parahaemolyticus*. *Ann. Rev. Med.*, **25**, 75 (1974).
21. 김상철, 정중교, 이상조: 경북 동해연안의 해수및 어패류의 미생물의 오염에 관한 조사연구. 경북보건환경연구원보, **2**, 21 (1990).
22. Baross, J.: Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related Hemolytic *Vibrios* in marine environments of washing to state. *Appl. Microbiol.*, **20**, 179 (1970).

23. 장동석: 장염비브리오균의 분포 및 생리적 특성에 관한 연구. 국립수산 진흥원 연구보고, **19**, 7 (1977).
24. Nishina, A., Kiraha, H., Uchibori, T. and Oi, T.: Antimicrobial substances in DF-100, extract of grapefruit seeds. *J. of Antibacterial and Antifungal Agents.* **19**, 401-404.
25. Harich, J.: DF-100. *U.S. patent*, 1,354,818. FDA No. R-0013982 (1982).