최 종
연구보고서

고품질 우유의 생산 기술 개발

Technical Development to Produce Milk of Good Quality

연 구 기 관
상 지 대 학 교

농 림 부

별지 제7호 서식]

최 종 보 고 서

1996년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 고품질 우유의 생산 기술 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

1999. 10. 31.

주관연구기관 : 상 지 대 학 교

총괄연구책임자 : 최 석 호 (인)

주관연구기관장 : 상지대학교 총장 직인

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "고품질 우유의 생산 기술 개발" 과제 (주관연구과제 : 시유의 저장가능기간과 2차오염의 결정 기술 개발, 협동연구과제 : *Staphylococcus aureus*와 streptococci의 원유 오염 경로에 관한 연구)의 최종보고서로 제출합니다.

1999 . 10 . 29 .

주관연구기관명 : 상지대학교
총괄연구책임자 : 최 석 호
연 구 원 : 이 승 배
연 구 원 : 김 선 기
연 구 원 : 노 동 광
연 구 원 : 황 보 식
연 구 원 : 권 우 혁
연 구 원 : 최 정 준
협동연구기관명 : 중앙대학교
협동연구책임자 : 윤 영 호
연 구 원 : 김 창 수
연 구 원 : 김 기 일

요 약 문

I. 제 목 : 총괄제목 : 고품질 우유의 생산 기술 개발
주관연구과제 : 시유의 저장가능기간과 2차오염의 결정 기술 개발
협동연구과제 : *Staphylococcus aureus*와 streptococci의 원유 오염 경로에 관한 연구

II. 연구개발 목적 및 중요성

무역자유화에 따라 식품의 안전성을 보장하기 위하여 HACCP가 도입되고 있다. 또한 소비자들은 식품의 안전성에 대한 관심이 증폭되고 있으며 특히 우유는 어린이, 임신부 및 노년층의 영양에 중요한 식품이므로 우유의 안전성은 더욱 중요하다. 이러한 사회적 여건 변화 하에서 체세포수, 잔류항균물질, 식중독 및 대장균의 오염 등이 우유와 더 이상 연관되어지지 않아야 할 것이다.

따라서 낙농가와 유가공장은 소비자에게 안전성을 보증하고 신선한 풍미가 있는 고품질 우유를 지속적으로 생산하여야할 것이다. 이를 위하여 첫째로 낙농가에서는 건강한 젖소의 위생적인 사양과 착유에 의해 신선한 원유가 공급되어야 하며 둘째로 유가공장에서는 위생적인 시유 생산 공정과 공장 관리 방법을 확립하고 유통체계를 관리하여 안전하고 저장성이 좋은 시유를 생산하여 소비자에 공급될 수 있어야 한다.

이 연구의 목적은 고품질 우유를 생산하기 위하여 유가공장과 낙농가의 현장에서 필요한 기술과 정보를 제공하기 위한 것이다. 주관연구과제의 목적은 시유의 저장가능기간을 개선하기 위하여 필요한 정확하고 신속한 시유의 2차오염 검출 방법을 개발하는 것이며 협동연구과제의 목적은 유방염균의 목장내에서 분포와 원유에로의 유입경로 및 항균물질에 대한 감수성에 대하여 연구하였다.

1. 주관연구과제

열처리된 시유는 살균 후 원유 또는 유가공 기계로부터 2차 오염이 일어날 수 있다. 2차 오염된 우유가 냉장 저장될 때에 내냉성 세균이 증식하여 저장가능기간(shelf life)이 단축하게 된다. 우유를 위생적으로 열처리하고 2차 오염을 방지할 수 있는 유가공 기계의 설계와 가동 방법이 중요하다. 또한 우유의 2차 오염 여부를 판정하고 저장가능기간을 예측할 수 있는 품질관리방법이 필요하다.

본 연구의 목적은 예비배양 방법과 분자유전학적 방법을 이용하여 시유의 2차오염을 신속히 검출할 수 있는 방법을 개발하는 것이다. 본 연구에서 개발된 resazurin 환원시간검사 방법에서 사용하는 SC-TS 배지의 그람음성세균에 대한 선택성과 재현성을 증명하여 현장에서 실용화할 수 있도록 방법의 구체적인 절차를 보고하였다. PCR을 이용한 분자유전학적 기술을 개발하여 시유의 2차오염의 검출 가능성을 증명하였다.

2. 협동연구과제

원유 중에 오염된 *Staphylococcus aureus* 및 streptococci는 원유품질에 있어 원유 품질을 저하시키는 중요한 변패 미생물로 인정되고 있으며, 특히 *Staphylococcus aureus* 균주는 enterotoxin을 생산하여 식중독 원인균으로 작용할 수 있어 위생 면에 있어서도 중요한 미생물이다. 이들은 우유의 생산량을 현저히 저하시키는 원인으로 임상형 또는 준임상형의 유방염 원인으로도 작용하고 있다. 우유생산 현장인 목장에서 이 미생물에 대한 분포와 우유로 오염되는 경로의 파악과 목장 환경중에 분포 현황의 파악과 목장 내에서의 확산을 방지할 수 있도록 관리기술을 습득하는 것이 필요하다. 또한 유방염 병원균의 항생제와 소독제에 대한 감수성을 조사하여 적절한 예방과 치료를 수행 할 수 있다.

본 연구의 목적은 낙농목장에서 *Staphylococcus aureus* 및 streptococci 균주들의 동정 기법과 PFGE 방법과 dendrogram을 이용하여 균주 동정 및 genotyping을 하여 유전자 type 별로 분류하여 목장내 유방염균들의 분포에 대하여 조사하는 것이다. 분리된 균주들의 항생제와 소독제에 대한 민감도를 측정하여 현장에서 항생제와 소독제의 적정 사용량을 구명하는 것이다. 임상수의사 수준에서도 용이하게 유방염 원인균의 genotyping할 수 있도록 간편하고 신뢰성이 있으며 저비용으로 가능한 실용성 있는 RAPD 방법을 개발하는 것이다.

III 연구 개발 내용 및 범위

1. 주관연구과제

국내에서 시판되고 있는 시유를 구입하여 냉장 저장 중 시유의 세균수 변화를 조사하고 내냉성 그람음성세균을 분리하여 동정하였다. 시유의 냉장저장 온도에 따른 세균수의 변화에 대하여 조사하였다. 시유의 저장가능기간과 2차오염을 결정할 수 있는 방법으로 Mosley 법, 세균수 계수법, ATP-bioluminescence, impedance 및 resazurin 환원시간검사를 연구하였다. 이 방법들은 저온에서 예비배양한 후에 세균수 또는 세균대사산물을

조사하는 방법이다. Resazurin 환원시간 검사에 사용한 SC-TS 배지의 그람음성세균에 대한 선택성을 비교조사하였다. Resazurin 환원시간 검사방법을 국산 시유에 응용하여 2차오염 검출을 위한 재현성을 연구하였다. 민감한 그람음성세균 검출법으로서 semi nested PCR을 개발하여 이에 필요한 primer의 염기서열을 결정하고 간단하고 신속한 세균 전치리법을 확립하였다.

2. 협동연구과제

경기도 지역에 위치한 10 목장에서 우유를 위시하여 유우 개체의 표면부위별 시료 및 착유환경 요인이 되는 착유자, 착유기, 축사, 사료, 용수등에서 시료를 채취 한 후 유방염 원인균인 *Staph. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. uberis* 및 *Str. dysagalactiae*를 분리 동정하였다. 균종 수준까지 동정을 실시하고 분자유전학적인 방법으로 확인시험을 실시하였다. *Staph. aureus*의 enterotoxin type을 PCR로 결정하여 활용가능성을 검토하였다. PFGE에 의한 균주의 genotype 결정와 genome 특성조사를 위하여 분석최적조건을 결정하였다. 동일 genotype에 속하는 균주가 목장환경 중에 분포하는 양상을 분석하여 원유로의 오염경로를 추적하였다. 균주에 대하여 19종의 항생제에 대한 감수성 시험을 실시하여 감수성 pattern을 분석하였다. 소독제에 대한 감수성을 시험하여 최적 감수성을 나타내는 소독제의 종류와 농도를 제시하였다. 항생제 내성유전자를 보유하고 있는지 여부를 분리균주와 표준균주에서 PCR을 이용하여 확인하였다. 신속한 genotyping을 위하여 RAPD를 PFGE의 대체방법으로서 활용할 수 있는 조건을 찾는 실험을 실시하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

가. 주관연구과제

열처리 방법과 저장 온도에 따른 저장 중의 시유의 세균수의 변화를 조사하였다. 저온장시간살균유 두 제품을 제외한 모든 시유의 세균수는 7℃에서 10일 동안의 저장 중에 유의성있게 증가하지 않았다. 5일간 저장 후의 세균수와 10일 저장한 후의 세균수간의 상관계수는 0.68이었으며 생산 일에서의 세균수에 대한 5일 저장후의 세균수의 비율과 10일 저장후의 세균수간의 상관계수는 0.73이었다. 저온장시간살균유와 고온단시간살균

유는 10℃, 13℃, 및 15℃에서 10일간 저장할 때에 세균수가 10^6CFU/㎖ 이상으로 증가하였으나 7℃에서는 증가하지 않았다. 초고온순간살균유는 13℃와 15℃에서 10일간 저장할 때에 10^6CFU/㎖이상으로 증가하였으나 7℃와 10℃에서는 2,500CFU/㎖ 미만에 머물었다.

시유를 7℃에서 5일 또는 10일간 저장한 후의 세균수, 21℃에서 18시간 예비배양한 후의 내냉성세균수 및 동량의 dairy gram negative 배지와 혼합하여 21℃에서 18시간 예비배양한 후의 그람음성 내냉성세균수와 저장가능기간과의 상관관계를 조사하였다. 시유를 5일 또는 10일간 저장한 후의 세균수와 저장가능기간간의 상관계수는 각각 -0.71과 -0.81이었다 ($P<0.01$). 21℃에서 18시간 예비배양된 시유의 내냉성세균수과 시유에 동량의 DGN 배지를 첨가하여 21℃에서 18시간 예비배양한 배양액의 세균수에 대한 시유의 저장가능기간의 상관계수는 각각 -0.48과 -0.56이었다 ($P<0.05$). Dairy gram negative agar는 crystal violet tetrazolium agar와 0.01% benzalkonium chloride를 함유하는 plate count agar 보다 그람음성세균에 대해 선택성이 높았다. 이러한 결과들은 우유에 오염된 내냉성세균의 활성이 우유의 저장성에 대한 영향력이 크다는 것과 예비배양 방법을 이용한 시유의 신속 저장성 측정법들은 저장가능기간과 어느 정도의 상관관계가 있었지만 개선할 필요가 있음을 알 수 있었다.

ATP bioluminescence와 전기저항법을 이용하여 시유의 2차오염을 예측할 수 있는 방법을 조사하였다. DGN 배지, BG-TGY 배지 및 CV-TGY 배지에 접종한 탈지유를 첨가하고 배양한 후에 ATP bioluminescnece 방법으로 측정한 결과 BG-TGY 배지는 *Pseudomonac fluorescens*의 성장을 억제하였으며 DGN 배지와 CV-TGY는 그람양성세균만을 억제하였다. 배양온도가 30℃일 때가 25℃일 때보다도 ATP bioluminescece 값이 높았으며 DGN 배지에서 배양하여 측정한 ATP bioluminescece 값이 냉장 후의 세균수와 일정한 관계를 갖지 못하였다. 전기저항법을 사용하면 CFC 배지에서 *Pseudomonas*와 *E. aerogenes* 만이 성장하였으며 DGN 배지에서 그람음성세균뿐만 아니라 *E. faecalis*와 *S. aureus*가 성장하였으며 Pseudosel 배지에서는 그람양성세균은 억제되고 그람음성세균이 성장하였다. 시유에 SC-TS 배지를 첨가하여 배양한 후에 전기저항법으로 측정하므로서 저온장시간 살균시유의 2차오염을 검출할 수 있었으나 초고온순간 살균 시유는 검출할 수 없었다.

시유의 2차오염 검출과 저장성의 예측방법으로서 색소환원방법과 그람음성세균의 선택배지를 개발하였다. Methylene blue 환원방법은 *Pseudomonas*를 검출하지 못하여 그람음성세균 검출 방법으로서 적절하지 못하였으며 반면에 resazurin 환원방법은 검출할 수 있었다. 그람음성세균 선택배지로서 cephaloridine-fucidine-cetrimide(CFC) 배지, dairy

gram-negative(DGN) 배지 및 Pseudosel 배지를 비교하였다. CFC 배지는 그람양성세균 뿐만 아니라 *Escherchia coli* 및 *Klebsiella pneumoniae*의 성장을 억제하였다, DGN 배지는 그람음성세균과 *Entercoccus faecalis*와 *Lactococcus* sp.와 같은 그람양성구균이 성장하였다. Pseudosel 배지에서는 그람음성세균만이 성장하였다. DGN 배지와 Pseudosel 배지를 첨가하 혼합한 시유를 배양하여 resazurin 환원법으로 검사한 결과 환원이 검출된 시유 배양액에서 각각 그람양성구균과 포자를 형성하는 그람양성간균이 검출되었다. Pseudosel 배지에 desoxycholate를 첨가한 배지에 시유를 혼합하여 배양하면 포자형성 그람양성간균의 생장이 억제되어 그람음성세균이 오염된 제품을 특이적으로 검출할 수 있었다.

SG-TS 배지를 이용한 resazurin 환원시간 검사방법의 국산 시유에 적용함에 있어 타당성을 조사하고 2차오염이 일어난 국산 시유로부터 그람음성세균을 분리하여 동정하였다. SG-TS agar는 그람양성세균의 성장을 억제하였고 SG-TS 배지를 시유와 혼합하여 21℃, 25℃ 및 30℃에서 배양한 resazurin 환원시간 검사에서 분리한 세균 중에 그람양성세균이 검출되지 않았다. 5월, 6월 및 9월에 생산된 시유는 resazurin 환원시간 검사와 냉장저장 후의 세균수 측정 검사가 상호간 확율이 높게 일치하는 결과를 보였으나 7월과 8월에 생산된 시유는 resazurin 환원시간 검사와 냉장저장 후의 세균수가 측정 검사가 상당히 차이를 나타냈다. 저온장시간살균유는 그람음성세균에 의한 오염이 높았으며 초고온순간살균유는 제품과 계절에 따라 변화하였다. 냉장 저장한 후 10^6CFU/㎖ 이상의 세균수를 나타내는 시유에서 분리하여 동정한 세균은 *Pseudomonas*가 전체 동정한 세균의 50%를 초과하였으며 다음으로 *Acinetobacter*와 *Aeromonas*이었으며 21℃에서 SG-TS 배지와 혼합하여 배양한 시유에서는 *Acinetobacter*, *Pseudomonas* 및 *Enterobacter*가 다수 동정되었다.

그람음성세균 특이성 primer을 semi nested PCR에 사용하여 그람음성세균을 2CFU까지 검출할 수 있는 분자유전학적 방법을 개발하였다. GNF1과 GNR2, GNF2와 GNR2 및 UNIV와 GNR2의 primer 쌍을 사용한 PCR은 *Enterococcus faecalis*의 DNA로부터 16S rDNA를 합성하지 않았으며 *Pseudomonas fluorescens*의 DNA로부터 16S rDNA를 합성하였다. Boiling 법을 사용하여 2CFU의 *P. fluorescens*의 DNA 추출물로부터 DNA가 합성되었다. 초고온순간살균 시유와 저온장시간살균 시유로부터 PCR에 의해 16S rDNA가 합성되었다. LTLT-살균우유에 *P. fluorescens*로 첨가한 후에 65℃, 80℃ 100℃에서 30분간 가열한 시료에서 16S rDNA가 합성되었다. 그러나 121℃에서 15분간 autoclave한 시료에는 합성되지 않았다. *P. fluorescnes*를 첨가한 시유를 65℃에서 30분간 살균한 후 1U DNase로 처리하였을 때에 16S rDNA가 합성되지 않았다. *Achromobacter lyticus*와

*Alcaligence faecalis*를 제외한 그람음성세균으로부터 16s rDNA 합성되었으며 그람양성세균에서는 합성되지 않았다. 이상의 결과로부터 PCR 방법으로 시유에 오염된 그람음성세균을 검출할 수 있음을 보였다.

나. 협동연구과제

우리 나라 경기도 일원의 낙농목장에서 동절기와 하절기에 우유시료, 체표면 시료 및 환경시료 등으로 구분하여 총수는 572점을 채취하여 동정하고 그 분포특성과 분자생물학적인 동정방법에 의한 동정의 가능성을 시험하여 다음과 같이 그 결과를 얻었다. 전염성 유방염의 대표적인 원인균이 되는 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus agalactiae* 그리고 환경성 유방염의 원인균이 되는 *Streptococcus uberis*와 *Streptococcus dysagalactiae*의 시료 중 검출율을 분석하였던 바 각각 29.2%, 3.2%, 11.4% 및 6.8%로 분포빈도로 볼 때 가장 중요한 균주는 *Staphylococcus aureus*로 나타났으며, 하절기의 검출율이 동절기보다 높아져 있는 경향을 보였다.

균주별로 그 유전자 type을 구분하고 적절히 예방하기 위한 대책 수립의 기초자료로 활용하기 위하여 *Staphylococcus aureus* 46 균주, *Streptococcus agalactiae* 7 균주, *Streptococcus uberis* 20 균주 및 *Streptococcus dysagalactiae* 21 균주와 그 외 표준균주를 확보하여 보존균주로 확보하였다.

균속 및 균종 수준으로 유방염 원인균을 신속 간편한 동정방법의 적용 가능성을 검토하여 16S-23S intergenic spacer region의 rRNA primer STAA-AuI, STRU-UbI 및 STRD-DyI를 사용할 수 있었다. 또한 표준균주를 이용한 실험에서 *Staphylococcus aureus*가 생산하는 enterotoxin type을 PCR 방법으로 결정할 수 있었다.

유방염의 원인균인 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus* spp.의 분리균주에 대한 동정과 typing을 위하여 genomic DNA의 PFGE 분석을 시행하였고 typing 결과에 따라 원유중의 오염경로를 추적하였으며 genomic DNA의 특성을 구명하였다. PFGE 분석을 위한 genomic DNA 절편 생성을 위한 제한효소로는 *Sma*I이 가장 적합하였고, 전기영동 조건으로 최적조건은 pulse time은 5-40sec이고 전기영동 시간은 22시간이 가장 적합하였다.

*Staph. aureus*의 genomic DNA는 2.0Mb에서 3.0Mb의 크기를 가지며 genome 구조는 매우 다양한 형태로 이루어 진 것으로 확인되었으며, *Streptococcus* spp.의 크기도 2.0-3.0Mb의 크기를 나타내었다.

절편 크기 분포에 따른 typing 결과 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* 및 *Streptococcus dysagalactiae*는 각각 19, 7 및 11개의 genotype으로 분류 할 수 있었다. 목장환경 중의 분포와 우유 중

의 분포상태 및 genotype를 고려하여 우유 중에 오염경로 추적이 가능하였다. 사료와 변에 존재하던 원인균이 직장, 질, 체표면 및 유방으로 이동되고, 유두, 착유기 내부 및 원유로 이동하는 경로를 고려 할 수 있고, 사료 및 축사 바닥 등으로부터 체표면으로 이동하여 다시 유두와 착유기 내부로 이동하는 경로를 추정할 수 있었다. 축사바닥, 체표면, 비경부위 및 유두부위에 오염된 원인균은 결국 원유로 오염되는 경로를 통하게 된다는 것은 동일 type의 원인균이 존재해 있는 부위를 근거로 하여 추정할 수 있었다.

Staph. aureus 47 균주와 streptococci 49 균주에 대해 항생제와 소독제에 대한 감수성 실험을 실시하여 다음 결과를 얻었다. *Staph. aureus*는 ampicillin-sulbactam과 vancomycin에 대하여 가장 높은 감수성을 보였고, trimethoprim-sulfamethoxazole과 imipenem 순서로 높은 감수성을 보였다. *Str. dysagalactiae*은 trimethoprim-sulfamethoxazole, imipenem 및 ampicillin-sulbactam 순서로 강한 감수성을 보였으며, *Str. agalactiae* 균주는 amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin- sulbactam 및 imipenem 등에 강한 감수성을 보였고, *Str. uberis*의 경우 amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam 및 imipenem, trimethoprim-sulfamethoxazole 순서로 높은 감수성을 보였다. 항생제 유전자인 β-lactamase gene이 표준균주와 분리균주에 존재하고 있음을 확인하였다.

*Staph. aureus*의 소독제에 대한 감수성은 4급암모늄제인 Germex에 대하여 가장 높은 감수성을 보였고, *Str. dysagalactiae*는 요오드제인 Betadin에 높은 감수성을 보였으며 또한 *Str. agalactiae*의 경우에도 Betadin이 높은 감수성을 보였고, *Str. uberis*는 Farmfluid S에 대하여 높은 감수성을 나타내었다. Chloramphenicol에 대한 최소억제농도를 Bioscreen 장치로 측정한 결과 *Staph. aureus* 30㎍/㎖, *Str. agalactiea*와 *Str. uberis*는 50㎍/㎖이며 *Str. dysagalactiae*는 50㎍/㎖에도 억제가 되지 않았다.

유방염의 원인균인 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus* spp.의 genotyping 방법 중에서 PFGE 방법을 대체할 수 있는 신속 정확한 대체방법으로서 genotype의 판별능력과 적정 primer의 선택 및 재현성을 검토한 결과 RAPD 방법을 적용 할 수 있는 것으로 확인되었다. Genomic DNA purification kit를 이용하여 DNA 분리하고 본 연구에서 고안된 KIKI primer(TGCACTGATG)를 사용하여 PCR을 수행하며, RAPD에 있어서의 cycler 조건은 최초 denaturation 93℃에서 3분간 수행하고 denaturation 93℃에서 1분, annealing 37℃에서 1분 및 extension 72℃에서 1분의 1회를 35회 반복하였고 마지막으로 extension은 72℃에 4분간 수행한다. 전기영동

은 1.5% agarose gel을 이용하여 100V에서 2시간 수행하는 방법으로서 genotyping과 균주동정에 유효하게 활용될 수 있다.

대상목장에서 나타나는 모든 유방염 원인균에 감수성을 나타내는 항생물질은 amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin sulbactam, chloramphenicol이었다. 또한 *Streptococcus uberis*에서 genotyping을 통한 항생제 및 소독제 감수성을 추적한 예를 제시하여 genotyping을 통하여 특성을 신속히 탐지하는 방법을 예시하였다.

2. 연구결과 활용 및 건의

주관연구과제에서의 연구 결과로부터 다음과 같은 활용방안을 제시할 수 있다.

국산 시유의 저장성을 조사하여 2차오염의 문제점을 확인하였으며 일부 시유는 지속적으로 살균 후 오염되었으며 특히 여름철에는 많은 시유가 2차오염 되어 문제가 심각하였다. 그러므로 유가공장은 2차오염을 방지하기위한 공장관리와 품질관리가 필요하다.

저온장시간살균유와 고온단시간살균유는 10℃에서 저장할 때에 세균의 성장이 일어나 부패하므로 저장온도를 최소한 7℃이하로 하여야한다. 따라서 식품공전에서의 시유의 유통 및 저장 온도를 0-10℃에서 0-7℃로 개정해야 할 필요가 있다.

개발된 resazurin 환원시간 검사법은 시유의 2차오염을 검출하고 저장가능기간을 개선할 수 있는 신뢰성 있는 품질관리방법으로서 유가공장에서 도입할 필요가 있다. PCR을 이용하여 시유에 첨가된 그람음성세균을 검출할 수 있는 방법이 개발되어 이의 실용화가 필요하다.

협동연구과제 연구결과를 효과적으로 활용함에 있어서 부분별로 그 활용도를 높이기 위하여 다음사항을 건의한다.

이 연구는 우리 나라의 모델이 될 수 있는 중소형 혹은 대형 낙농목장의 유방염 원인균의 오염현황과 그 정도에 관하여 현상을 조사한 결과이므로 목장의 위생 관리에 필요한 주요 관리점을 발견할 수 있다 따라서 이 결과를 목장의 관리자가 읽어서 목장의 위생 관리에 반영할 수 있도록 '유방염의 예방과 관리'를 이 보고서의 부록으로서 발간하였다. 목장의 위생관리를 지도 감독하는 각 도 가축위생시험소의 담당공무원도 참고할 필요가 있다.

균종 동정을 분자생물학적 방법으로 확인하는 기법은 현장에서 더 많은 연구와 관리목적으로 활용될 수 있으므로 이 방법에 대한 활용기법에 대한 수의직 연구원 및 위생관리 공무원에 대한 보급은 경기도 축산위생연구소 김창수 과장이 본 연구에 참여하였으므로 경기도 축산위생시험소

를 중심으로 확산해 나가는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

유방염 원인균의 genomic DNA의 구조를 PFGE 기법을 사용하여 결정하고 genotype으로 분류한 연구 결과를 제시하였다. 이 결과를 이용하여 1) 동일 genotype의 유방염 원인균의 분포상태를 분석하여 목장에서 소독을 철저히 해야할 장소의 구분에 활용할 수 있고, 2) 병원균의 역학적 조사의 자료로 활용하고 환경 및 우사의 각 부위에 존재하는 병원균이 어떠한 경로를 통하여 우유와 유방으로 오염 가능할지를 파악할 수 있어 오염경로를 추정하고 그 확산을 차단하는 자료로 활용할 수 있으며 3) 균주 동정과 genotyping의 문제는 여러 가지 병원균에서 해결해야할 주요 과제인 동시에 이에 기준하여 병원균의 병원성, 항원성, 효소생성능력 및 약제내성 등 여러 가지 특성결정 요인이 genome에 의하여 결정되며, 유방염 효과적으로 관리를 위한 관계 연구자에게 참고자료가 되므로 대학과 연구소에서 활용할 필요가 있다.

SUMMARY

Subject 1: Technical Development to Determine Post-pasteurization Contamination and Shelf Life of Market Milk

1. Purpose of Study

To develop selective medium to detect gram-negative bacteria, to apply microbiological method to detection of post-pasteurization contamination of market milk and to develop PCR method to detect gram-negative bacteria in milk.

2. Results and Conclusion

The standard plate counts of all market milk except some LTLT-pasteurized milk did not increase significantly during storage at 7℃ for 10 days. The correlation coefficient between the SPCs after storage for 5 days and 10 days was 0.68($P<0.01$). The correlation coefficient between the ratio of the SPC after storage for 5 days to that at the production day and the SPC after storage for 10 days was 0.73. The SPCs of LTLT- and HTST-pasteurized milk increased to more than 10^6CFU/㎖ during storage at the temperature higher that 10℃, 13℃ and 15℃ for 10 days. The SPC of UHT-pasteurized milk increased to more than 10^6CFU/㎖ during storage at the temperature higher than 13℃.

The correlation coefficients between shelf life and SPC after storage for 5 and 10 days were -0.71 and -0.80($P<0.01$), respectively, which indicated that the activity of psychrotrophic bacteria in milk determined the shelf life during refrigerated storage. The correlation coefficients between shelf life and mPBC after preliminary incubation at 21℃ for 18 hours with and without addition of DGNB were -0.56 and -0.48($P<0.05$), respectively. Dairy gram negative agar was better selective media for growth of gram-negative bacteria than crystal violet tetrazolium agar and plate count agar containing 0.01% benzalkonium chloride. The results suggested that the rapid methods to predict the shelf life of market milk by using mPBC after preliminary incubation should be improved.

ATP bioluminescence method showed that tryptone glucose yeast extract broth containing benzalkonium chloride inhibited growth of *Pseudomonas fluorescens* as well as gram positive bacteria and that dairy gram negative(DGN) broth and TGY broth containing crystal violet inhibited growth of gram positive bacteria only. The bacterial counts after storage at 7℃ for 10 days of most LTLT-pasteurized market milk from plant A were more than 10^6 CFU/㎖, which indicated post-pasteurization contamination. The ATP bioluminescence values after preliminary incubation at 30℃ were higher than that at 25℃. There was not consistent relationship between the ATP bioluminescence values after preliminary incubation with DGN broth and the bacterial counts after storage at 7℃ for 10 days. Impedance method showed that addition of CFC broth to skim milk culture resulted in growth of *Pseudomonas* and *Enterobacter aerogenes*. Addition of DGN broth to skim milk culture allowed growth of *Enterococcus faecalis* and *S. aureus* as well as gram negative bacteria.. Addition of Pseudosel broth inhibited growth of gram-positive bacteria but not gram-negative bacteria. Impedance method using trypticase soy broth containing sodium desoxycholate and cetrimide enabled detection of post-pasteurization contamination of LTLT-pasteurizaed milk but not UHT-pasteurized milk.

Resazurin reduction method and gram-negative bacteria selective broth were developed to detect post-pasteurization contamination in milk processing. CFC broth inhibited growth of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and all gram-positive bacteria. *Enterococcus faecalis*, and *Lactococcus* sp. as well as most of gram-negative bacteria grew in the mixture of skim milk and DGN broth. Only gram-negative bacteria grew in the mixture of skim milk and Pseudosel broth. The growth of gram-positive cocci and spore-forming gram-positve bacilli in market milk which was mixed with DGN broth and Pseudosel broth, respectively, was detected. Addition of sodium desoxycholate to Pseudosel broth inhibited spore-forming gram-positive bacilli and enabled selective detection of gram-negative bacteria in market milk.

Resazurin reduction time test including preliminary incubation of market milk with SC-TS broth was studied to apply to market milk produced in different months. Gram-positive bacteria did not grow on

SC-TS agar but gram-negative bacteria did. All of the bacteria isolated from resazurin reduction time test were gram negative bacteria, which showed that SC-TS medium is reliable for using resazurin reduction time test to detect post-pasteurization contamination of market milk. Resazurin reduction time test and bacteria number of market milk after cold storage in May, June and September were highly related each other but not in July and Autumn. *Pseudomonas* was the most frequently identifed gram-negative bacteria of all isolated from the market milk after cold storage. *Acinetobacter* and *Aeromonas* followed. *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Enterobacter* were frequently identified in resazurin reduction time test where preliminary incubation of mixture of skim milk and SC-TS media was done at 21℃ for 18hr.

PCR method to detect gram-negative bacteria up to 2CFU was developed. PCR with primer pairs of GNF1 and GNR2, UNIV and GNR2, and GNF2 and GNR2 amplified 16S rDNA from purified DNA of *Pseudomonas fluorescens* but not *Enterococcus faecalis*. 16S rDNA was amplified from LTLT-pasteurized milk and UHT-pasteurized milk by using semi nested PCR. 16S rDNA was amplified from LTLT-pasteurized milk which was added with *P. fluorescens* and heated at 65℃, 80℃, 100℃ for 30 min but not from that autoclaved at 121℃ for 15min. 16s rDNA was amplified from gram-negative bacteria except *Achromobacter lyticus* and *Alcaligens faecalis*, but not from gram-positive.

The results indicated that there were problems of post-pasteurization contamination of market milk. Resazurin reduction time method could be used to detect post-pasteurization contaminaton of milk and to determine shelf life. PCR method was shown to detect gram-negative bacteria in milk.

Subject 2 : Study on Contamination Route of *Staphylococcus aureus* and Streptococci into Milk

1. Purpose of Study: To determine route of *Staph. aureus* and streptococci to contaminate raw milk and to determine their sensitivity to antibiotics and disinfectants.

2. Results and Conclusion

Specimens were taken from the milk, body surfaces of dairy cow and environments of ten dairy farms located in Kyunggido, Korea. Identification of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysagalactiae* by using IDF method and PCR method from 572 samples taken during winter and summer season was conducted. Isolation rates of *Staph. aureus* and *Str. agalactiae* which are classified as contagious mastitis pathogen were 29.2 % and 3.2%, respectively and those of environmental mastitis pathogen *Str. uberis* and *Str. dysagalactiae* were 11.4% and 6.4%, respectively.

In order to identify species of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp., PCR performed with rRNA primers STAA-AuI, STRU-UbI, STRD-DyI from 16S-23S intergenic spacer region amplified specific DNA products for those species. By using specific primers, strains of *Staph. aureus* producing six types of enterotoxin A, B, C, D, E, and TSST-1 were effectively differentiated.

Pulsed field gel electrophoresis of *Sma*I-digested genomic DNA of *Staph. aureus* and *Streptococcus* spp. was undertaken for genome characterization and genotyping. The contamination routes of the pathogens into raw milk were postulated.

*Sma*I was chosen for the PFGE analysis of *Staph. aureus* and *Streptococcus* spp. genomic DNA and optimum condition for PFGE found to be pulse time of 5-40 second and running time of 22 hours. Sizes of the genomic DNA of *Staph. aureus* and *Streptococcus* spp. averaged 2.3Mb. Genotyping results indicated that 52 strains of *Staph. aureus*, 18 strains of *Str. uberis* and 22 strains of *Str. dysagalatiae* were classfied into 19 types, 7 types and 11 types, respectively.

Antibiotic- and disinfectant-susceptibility determination of *Staph. aureus*. and *Streptococcus* spp. was undertaken to get data for effective control of mastitis. *Staph. aureus* was shown to be very susceptible against ampicillin-sulbactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, vancomycin and imipenem in order. *Str. dysagalactiae* was susceptible to ampicillin-sulbactam, imipenem and

trimethoprim-sulfamethoxazole. *Str. agalactiae* was highly susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, trimethoprim-sulfamethoxazole and mipenem. *Str. uberis* was highly susceptible to amoxicillin- clavulanic acid and ampicillin-sulbactam. Germex, a quarternary ammonium compound was the most effective disinfectant against *Staph. aureus*. Betadin, an iodine compound was the highest effective against *Str. dysagalactiae* and *Str. agalactiae*. FarmfluidS was the most effective disinfectant against *Str. uberis* of all. Minimal inhibitory concentration of chloramphenicol against *Staph. aureus, Str. agalactiae, Str. uberis, and Str. dysagalactiae* revealed as 30ug/ml, 50ug/ml, 50ug/ml and >50ug/ml, respectively.

RAPD method of genotyping and strain identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp. could obtain reliable results which shows simillar degree of strain differentiation ability and reproducibility as PFGE in shorter time with less analyzing cost. Isolated genomic DNA was amplified with newly designed primer KIK I. The PCR condition was initial denaturation at 93℃ for 3 minutes, 35 cycles of denaturation at 93℃ for 1 minutes annealing at 37℃ for 1 minutes, and extension 72℃ for 1 minutes, final extension at 72℃ for 4 minutes. The amplified DNA was electrophoresed at 100 volt for 2 hours with 1.5% agarose gel.

For the practical application of the results, common susceptible antibiotics against all the isolated strains turned out to be amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam and chloramphenicol. Bacterial strains sensitive to antibiotics and disinfectants could be related with PFGE genotypes.

CONTENTS

Chapter I. Introduction

Section 1. Purpose of study ---------- 20

Section 2. Scope of study ---------- 21

Chapter II. Technical Development to Determine Post-pasteurization Contamination and Shelf Life of Market Milk

Section 1. Bacterial count, shelf life and soluble whey protein content of market milk by heat treatment process and storage temperature --------- 22

Section 2. Preliminary incubation method to predict the shelf life of market milk ---------- 35

Section 3. ATP bioluminescence and impedance method to detect post-pasteurization contamination of market milk ---------- 45

Section 4. Gram-negative bacteria selective medium to detect post-pasteurization contamination of market milk by using dye reduction test ---------- 59

Section 5. Detection of Post-pasteurization contamination of market milk by using resazurin reduction time test and identification of gram-negative bacteria isolated from market milk ---------- 71

Section 6. Detection of gram-negative bacteria by using PCR-amplification of 16S rDNA and application to post-pasteurization contamination of market milk ---------- 96

Section 7. References ---------- 107

Chapter 3. Study on Contamination Route of *Staphylococcus aureus* and Streptococci into Milk

Section 1. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* and streptococci from dairy barn ---------- 112
Section 2. Pulsed field gel electrophoresis of genomic DNA from *Staphylococcus aureus* and streptococci and prediction of contamination route to milk --- 132
Section 3. Sensitivity to antibiotics and disinfectants of *Staphylococcus aureus* and streptococci -------- 153
Section 4. Applicaion of RAPD to genotyping of *Staphylococcus aureus* and streptococci ---------- 186
Section 5. References ---------- 204

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적 ---------- 20
제 2 절 연구개발의 범위 ---------- 21

제 2 장 시유의 저장가능기간과 2차오염의 결정 기술 개발

제 1 절 열처리 방법과 저장 온도에 의한 시유의 세균수, 저장가능기간 및 가용성 유청단백질의 변화 ---------- 22
제 2 절 시유의 저장가능기간 예측을 위한 배양방법에 관한 연구 ---------- 35
제 3 절 ATP bioluminescence와 전기저항법을 이용한 시유의 2차오염 검출법에 관한 연구 ---------- 45
제 4 절 색소환원법에 의한 시유의 2차오염 검출을 위한 그람음성세균 선택성 배지 ---------- 59
제 5 절 시유의 2차오염 결정하기 위한 resazurin 환원시간 검사와 그람음성세균의 동정 ---------- 71
제 6 절 16S rDNA의 PCR 합성을 이용한 그람음성세균의 검출과 시유의 2차오염에의 응용 ---------- 96
제 7 절 인용문헌 ---------- 107

제 3 장 *Staphylococcus aureus*와 Streptococci의 원유오염경로에 관한 연구

제 1 절 *Staphylococcus aureus*와 streptococci의 우유생산 환경 중에서 분리동정 및 분포상태 조사 ---------- 112

제 2 절 *Staphylococcus aureus*와 streptococci의 genomic DNA의 pulsed field gel electrophoresis 분석과 오염경로 ---------- 132

제 3 절 *Staphylococcus aureus*와 streptococci의 항생제 및 소독제에 대한 감수성 ---------- 153

제 4 절 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus* spp.의 genotyping 방법의 신속 간편화를 위한 RAPD 방법의 적용가능성 검토 및 현장 적응 방안 ---------- 186

제 5 절 인용문헌 ---------- 204

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

우유는 칼슘 함량이 높고 필수아미노산이 풍부한 단백질을 많이 함유한 영양가 높은 식품이다. 특히 어린이, 임신부 및 노년층의 영양에 중요한 식품이다. 따라서 낙농가와 유가공장은 병원균의 위해가 없어 안전하며 신선한 풍미가 있는 고품질 우유를 지속적으로 생산하여야할 것이다. 이를 위하여 첫째로 낙농가에서는 건강한 젖소의 위생적인 사양과 착유에 의해 신선한 원유가 공급되어야 하며 둘째로 유가공장에서는 위생적인 시유 생산 공정과 공장 관리 방법을 확립하고 유통체계를 관리하여 안전하고 저장성이 좋은 시유를 생산하여 소비자에 공급될 수 있어야 한다.

열처리된 시유는 살균 후 원유 또는 유가공 기계로부터 2차 오염이 일어날 수 있다. 2차 오염된 우유가 냉장 저장될 때에 내냉성 세균이 증식하여 저장가능기간(shelf life)이 단축하게 된다. 우유를 위생적으로 열처리하고 2차 오염을 방지할 수 있는 유가공 기계의 설계와 가동 방법이 중요하다. 또한 우유의 2차 오염 여부를 판정하고 저장가능기간을 예측할 수 있는 품질관리방법이 필요하다. 주관연구과제의 연구 목적은 예비배양 방법과 분자유전학적 방법을 이용하여 시유의 2차오염을 신속히 검출할 수 있는 방법을 개발하는 것이다.

원유 중에 오염된 *Staphylococcus aureus* 및 streptococci는 원유 품질을 저하시키는 중요한 변패 미생물로 인정되고 있으며, 특히 *Staphylococcus aureus* 균주는 enterotoxin을 생산하여 식중독 원인균으로 작용할 수 있어 위생면에 있어서도 중요한 미생물이다. 이들은 우유의 생산량을 현저히 저하시키는 원인으로 임상형 또는 준임상형의 유방염 원인으로도 작용하고 있다. 우유생산 현장인 목장에서 이 미생물에 대한 분포와 우유로 오염되는 경로로 파악하고 목장 내에서의 확산을 방지할 수 있도록 관리기술을 습득하는 것이 필요하다. 또한 적절한 항생제와 소독제에 대한 감수성에 대한 이해가 중요하다.

협동연구과제의 연구의 목적은 낙농목장에서 *Staphylococcus aureus* 및 streptococci 균주들의 분포현황을 파악하였다. 분리된 균주를 균주동정 기법으로 PFGE 방법과 dendrogram을 이용하여 균주동정 및 genotyping을 하여 유전자 type 별로 분류하여 목장내 유방염균들의 분포를 조사하는 것이다. 분리된 균주들의 항생제와 소독제에 대한 민감도를 측정하여 현장에서 사용할 항생제와 소독제 종류를 구명하는 것이다.

제 2 절 연구개발의 범위

주관연구과제는 국내에서 시판되고 있는 시유를 구입하여 냉장 저장 중 시유의 세균수 변화를 조사하여 시유의 2차오염의 현황을 조사하고 내냉성 그람음성세균을 분리하여 동정하였다. 시유의 냉장저장 온도에 따른 세균수의 변화에 대하여 조사하였다. 시유의 저장가능기간과 2차오염을 결정할 수 있는 방법으로 Mosley 법, 세균수 계수법, ATP-bioluminescence, impedance 및 resazurin 환원시간검사를 연구하였다. 이 방법들은 저온에서 예비배양한 후에 세균수 또는 세균대사산물을 조사하는 방법이다. resazurin 환원시간 검사에 사용한 SG-TS 배지의 그람음성세균에 대한 선택성을 비교조사하였다. Resazurin 환원시간 검사방법을 국산 시유에 응용하여 2차오염 검출을 위한 재현성을 연구하였다. 민감한 그람음성세균 검출법으로서 semi nested PCR을 개발하여 이에 필요한 primer의 염기서열을 결정하고 간단하고 신속한 세균 우유처리법을 조사하였다.

협동연구과제는 경기도 지역에 위치한 10 목장에서 우유를 위시하여 유우 개체의 표면 부위별 시료 및 착유환경 요인이 되는 착유자, 착유기, 축사, 사료, 용수 등에서 시료를 채취 한 후 유방염 원인균인 *Staph. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. uberis* 및 *Str. dysagalactiae*를 분리 동정하였다. 균종 수준까지 동정을 실시하고 분자유전학적인 방법으로 확인시험을 실시하였다. *Staph. aureus*의 enterotoxin type을 PCR로 결정하여 활용 가능성을 검토하였다. PFGE에 의한 균주의 genotype 결정과 genome 특성 조사를 위한 분석의 최적조건을 결정하였다. 동일 genotype에 속하는 균주가 목장환경 중에 분포하는 양상을 분석하여 원유로 오염경로를 추적하였다.

균주에 대하여 19종의 항생제에 대한 감수성 시험을 실시하여 감수성 pattern을 분석하였다. 소독제에 대한 감수성을 시험하여 최적 감수성을 나타내는 소독제의 종류와 농도를 제시하였다. 항생제 내성유전자를 보유하고 있는지 여부를 분리균주와 표준균주에서 PCR을 이용하여 확인한다.

신속한 genotyping을 위하여 RAPD-PCR를 PFGE의 대체방법으로서 활용할 수 있는 조건을 찾는 실험을 실시한다.

제 2 장 시유의 저장가능기간과 2차오염의 결정 기술 개발

제 1 절 열처리 방법과 저장 온도에 의한 시유의 세균수, 저장가능기간 및 가용성 유청단백질의 변화

SUMMARY

Changes in bacterial counts of market milk during storage were investigated in relation to heat treatment processes and storage temperatures. The soluble whey protein contents of the market milk were determined and the patterns of β-lactoglobulin and α-lactalbumin in SDS-PAGE were compared in order to estimate the condition of heat treatment process. The standard plate count (SPC) of all the market milk except some LTLT-pasteurized milk did not increase significantly during storage at 7℃ for 10 days. One LTLT-pasteurized milk had a high average SPC of 29,000CFU/㎖ at the production day. Another LTLT-pasteurized milk had an average SPC of 4.7×10^6CFU/㎖ after storage for 10 days. The correlation coefficient between the SPCs after storage for 5 days and 10 days was 0.68. The correlation coefficient between the ratio of the SPC after storage for 5 days to that at the production day and the SPC after storage for 10 days was 0.73. The SPCs of LTLT- and HTST-pasteurized milk increased to more than 10^6CFU/㎖ during storage at 10℃, 13℃ and 15℃ for 10 days but not at 7℃. The SPC of UHT-pasteurized milk increased to more than 10^6CFU/㎖ during storage at 13℃ and 15℃ but less than 2,500CFU/㎖ at 7℃ and 10℃. The soluble whey protein contents and the electrophoretic patterns of β-lactoglobulin and α-lactalbumin in two products of HTST-pasteurized milk were similar with UHT-pasteurized milk.

(Key word : milk, pasteurization, heat treatment, bacterial count, shelf life, whey protein)

1. 서 론

시유의 미생물학적 규격은 식품공전에 규정되어 있는 바와 같이 세균수가 1㎖당 20,000군 이하 대장균군수은 1㎖당 10군 이하이며 권장유통기한이 0 10℃에서 5일이다. 시유의 열처리 방법으로는 저온장시간살균법(LTLT pasteurization), 고온단시간살균법(HTST pasteurization), 초고온순간처리법(UHT)으로 구분되어 있으며 살균된 제품은 살균 후 즉시 10℃ 이하로 냉각되어야하며 2차 오염이 방지되도록 자동포장 공정으로 충전되어야한다(한국식품공업협회, 1994). 저온단시간살균법과 고온단시간살균법에 의해 원유 내 세균의 약 95 99%를 사멸할 수 있으므로 법적 규격에 맞도록 시유를 제조하기 위하여서는 원유의 세균수가 중요하다. 그러나 초고온순간처리법은 우유의 세균수를 10^9배 이상 감소시킬 수 있으므로 원유의 세균수에 의해 시유의 세균수가 영향을 거의 받지 않는다(Kessler, 1981).

살균(pasteurization) 후 우유에 원유 또는 유가공 기계로부터 2차 오염이 일어날 수 있다. 2차 오염된 우유가 냉장 저장될 때에 내냉성 세균이 증식하여 저장가능기간(shelf life)이 단축하게 된다. 적정한 온도와 시간으로 열처리되고 2차 오염이 안된 우유는 45℉(7.2℃)에서 14일간 저장하는 동안에 최소한 50% 이상의 제품이 1/㎖ 미만의 대장균군수와 20,000/㎖ 미만의 세균수를 나타낸다고 한다(Barnard 등, 1995). 우유를 위생적으로 열처리할 수 있으며 2차 오염을 방지할 수 있는 유가공 기계의 설계와 가동 방법이 중요하다. 또한 우유의 2차 오염 여부를 판정하고 저장가능기간을 예측할 수 있는 품질관리방법이 필요하다.

우유를 냉장 저장하면서 세균수를 측정하여 일정 기준이상을 초과하는 기간이나 불쾌한 냄새가 검출되는 기간을 저장가능기간(shelf life)으로 할 수 있다. McMeekin과 Ross(1996)는 식품 1㎖ 또는 1g 당 세균수가 10^7에 도달하면 부패되기 시작하며 세균수가 $10^{7.5}$가 되면 이미 부패된 것이라고 하였다. Bishop 등(1984)은 7℃ 이하에서 성장하는 세균들은 살균에 의해 파괴되므로 7℃를 우유의 저장가능기간을 결정하기 위한 저장 온도로 사용하였다. 저장된 우유의 변질여부를 ADSA score card를 이용한 관능검사로 판정하여 저장가능기간을 결정하였다.

우유의 저장성을 예측하는 방법으로서 7℃에서 5일간 배양한 후의 세균수와 생산 일의 신선한 우유의 세균수를 비교하여 저장성을 예측하는 Mosley 저장성검사(IDF, 1993; White 등, 1993)가 있다. 18℃ 또는 21℃에서 18시간 예비 배양한 우유를 Bactometer를 사용하여 21℃에서 배양하여 전기저항 검출시간을 결정하는 방법이 있다(Bishop 등, 1984). 우유를 21℃에서 18시간 예비 배양한 후 표준평판한천배지에 접종하여 21℃에

서 25-48시간 배양하여 형성된 군락을 계수 하는 방법이 있다. 이 방법들은 미국위생보건협회의 유제품검사 표준법으로 추천되고 있다(Byrne 등, 1989; White 등, 1993).

본 연구는 시유를 냉장 저장하면서 세균수를 조사하여 시유의 열처리 방법과 저장 온도의 영향을 조사하였으며 가용성 유청단백질의 함량과 전기영동상에서 유청단백질의 변화를 조사하여 시유의 열처리 방법의 조건을 추정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시유 제품

시유는 3개 협동조합, 2개 대학부속유가공장, 4개 유가공업체에서 생산되는 제품을 구입하였으다. 시유는 열처리 방법에 따라 저온장시간살균유, 고온단시간살균유, 초고온순간살균유를 각각 3제품을 구입하였다. 생산일에 또는 하루 전에 생산되어 대리점 또는 소매점에 도착된 우유를 구입하여 실험에 사용하였다.

나. 시유의 저장 실험

시유 200㎖를 250㎖ 용량의 멸균된 메디아병에 옮겨 7℃에서 저장하였으며 제조당일, 5일과 10일에 세균수를 측정하였다. 세균수는 standard plate count(SPC) 방법에 따라 standard method agar에 1㎖의 희석된 시료를 접종한 후 32℃에서 48시간 배양하여 계수하였다. 일부는 Petrifilm aerobic count(PAC) 방법을 사용하여 세균수를 측정하였다. PAC 방법은 Petrifilm의 밑바닥 필름위에 1㎖의 희석된 시료를 올려놓고 유연성 필름으로 덮고 성형틀판으로 누르면 원모양의 겔이 두 개의 필름사이에 형성되었다. 이 Petrifilm를 표준평판법과 동일한 방법으로 배양하여 계수하였다(Marshall, 1993).

PAC 방법와 SPC 방법간의 상관관계와 5일과 10일간 냉장된 우유의 SPC 간의 상관관계를 조사하기 위하여 상관계수(r)를 Sigmaplot(Jandel, USA)을 사용하여 계산하였다.

다. 전기영동

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis를 사용하여 β-lactoglobulin과 α-lactalbumin의 변성 여부을 조사하였다(최와

인, 1993; Laemmli, 1971). 우유 시료를 2% sodium dodecyl sulfate와 10% glycerin를 첨가한 pH 6.8의 62.5mM Tris 완충용액에 용해시킨 후 100℃에서 5분간 가열처리한 후 13% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다.

표준 단백질로서 bovine serum albumin(66,000), egg albumin(45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000), carbonic anhydrase(29,000), trypsinogen(24,000), trypsin inhibitor(20,100) 및 α-lactalbumin(14,200)을 사용하였다 (괄호 안은 분자량).

라. 가용성 유청단백질

가용성 유청단백질은 Harland-Ashworth 방법(Kuramoto 등, 1959)을 수정한 방법(최와 인, 1993)에 따라 우유에 NaCl 포화용액이 되도록 NaCl을 가하여 녹인 후 원심분리하여 가용성 단백질을 함유한 상등액을 분리하였다. 상등액에 일정량의 염산을 가하여 응고된 미세한 가용성 유청단백질 입자의 optical density를 420nm에서 측정하였고 또한 응고된 가용성 단백질을 원심분리하여 침전시킨 후 녹여서 Lowry 등(1951)의 방법을 사용하여 단백질 함량을 측정하였다(최와 이, 1994).

3. 결과 및 고찰

가. 시유의 세균수와 저장성 연구

국내에서 판매되고 있는 시유 중 저온장시간살균유 3제품(A, B, C), 고온단시간살균유 3제품(D, E, F), 초고온순간살균유 3제품(G, H, I)을 2 6회 구입하여 7℃에서 저장하며 구입일(생산일), 5일 후, 10일 후에 세균수를 표준평판법으로 측정하여 기하평균값을 계산하였다(Table 1).

저온장시간살균유 A는 제조당일의 세균수가 10,000 90,000CFU/㎖이었으며 6개의 시료 중 2개 시료가 10일 냉장 후 10^6CFU/㎖ 이상으로 세균수가 증가하였다. 저온장시간살균유 B는 세균수가 500 4,000CFU/㎖이며 냉장저장 후에 세균수가 약간 감소하는 경향을 보였다. 저온장시간살균유 C는 생산일에는 세균수가 500CFU/㎖ 미만이었으나 10일간 냉장저장 후 6개의 시료 중 4개의 시료가 10^6CFU/㎖ 이상으로 증가하였다.

고온단시간살균유 D와 E는 생산일에 세균이 검출되지 않았으며 냉장저장 후에도 세균이 증가하지 않았다. 이 제품들은 가열취가 강하여 초고온순간살균유와 비슷하였다. 고온단시간살균유 F는 제조당일 세균수가 40

0 1,700CFU/㎖이었다. 6개의 제품 중에서 1개의 제품이 10일 냉장저장 후에 10^6CFU/㎖을 초과하였다.

초고온순간살균유는 모두 생산일에 세균이 검출되지 않았다. 7℃에서 10일간 저장한 후에 600-700CFU/㎖로 약간 증가하였다. 시유를 SPC 방법과 PAC 방법을 이용하여 세균수를 측정하여 SPC 방법을 PAC 방법으로 대체하여 사용할 수 있는가를 조사하였다. SPC와 PAC의 상관계수는 0.99로서 1%의 유의 수준에서 고도의 유의성이 인정되었다 (Fig 1).

Table 1. Changes of standard plate count of market milk stored at 7℃

Heat Treatment	Processing plant	Number of Sample	Geometric mean of SPC (CFU/㎖)		
			0 day	5 day	10 day
LTLT	A	6	29,000	62,000	460,000
	B	6	1,600	1,900	1,400
	C	6	500	5,500	4,700,000
HTST	D	3	<25	32	9,500
	E	2	<25	<25	35
	F	6	810	1,500	100,000
UHT	G	3	<25	<25	600
	H	3	<25	260	600
	I	3	<25	<25	700

국산 시유와 가공유의 세균수는 각각 90-5,000CFU/㎖, 60-3,000CFU/㎖으로 보고되었다(김과 최. 1993). 국산 시유를 살균방법에 따라 조사한 결과 고온단시간살균유와 저온장시간살균유의 평균 세균수는 각각 6,730CFU/㎖, 4,960CFU/㎖이었고 초고온순간처리유에서는 세균이 검출되지 않았다고 보고되었다(강 등, 1995). 시유의 저장실험에서 일부 저온장시간살균유와 고온단시간살균유는 생산 후 각각 2일과 3일만에 100,000CFU/㎖까지 증가하여 법적 규격을 초과하였으며 초고온순간처리유는 생산 후 9일까지도 100CFU/㎖에 머물렀다고 보고되었다(강 등, 1995).

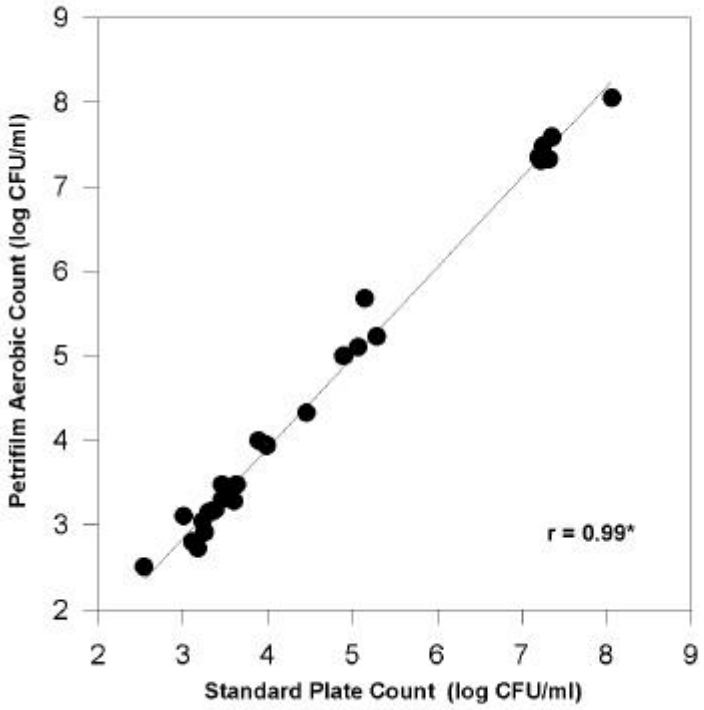


Fig. 1. Regression line of standard plate count versus Petrifilm aerobic count of milk

* P<0.01

본 연구에서 강 등 (1995)의 연구와 일부 유사한 연구 결과를 보였다. 저온장시간살균유 A는 제조 일에 세균수가 10^4CFU/㎖으로서 상당히 높았으며 일부는 저장 중에 세균수가 증가하였다. 이는 원유의 세균수가 높고 우유의 살균 후 2차 오염이 복합적으로 일어나기 때문이라고 할 수 있었다. 저온장시간살균유 A 중 일부는 냉장 중에 세균수가 증가하지 않아 2차 오염이 일어나지 않은 것으로 보였다 이 제품들이 제조 일에 세균수가 높은 이유는 원유의 세균수가 상당히 높았기 때문이라고 추측된다.

저온장시간살균유 C는 제조 일에는 세균수가 10^2-10^3CFU/㎖이나 저장 중 급격히 증가하여 10일에는 10^6CFU/㎖ 이상의 세균수에 이르렀다. 이 제품에는 내냉성 세균이 오염되어 저장 중에 증식하는 것으로 사료되었

다. 이러한 내냉성 세균은 열처리 공정에 의해 사멸되지 않는 포자의 생장세균일 수 있으며 또는 우유의 열처리 후 원유나 유가공 기계로부터 오염되는 2차 오염에 기인할 수 있다. 2차 오염은 세균의 오염정도에 따라 제조당일 제품의 세균수를 증가시킬 수도 있으나 대체로 2차 오염에 의해 우유에 오염된 세균수가 낮은 경우가 일반적이다(Bishop과 White, 1986). 따라서 2차 오염된 우유는 제조당일에는 세균수가 낮다하더라도 냉장 저장 중에 내냉성 세균이 성장하여 우유의 저장성을 감소시킬 수 있다. 포자의 생장세균이 성장하여 우유의 저장성을 감소시킬 수 있으나 2차 오염으로 기인되는 그람음성 내냉성 세균이 냉장 온도에서 성장이 빨라서 우유의 저장성에 더 중요한 세균이다(Varnam과 Sutherland, 1994).

초고온순간살균유들은 제조당일의 세균수가 낮았으며 냉장 저장 중에도 세균수가 낮았다. 초고온순간살균유들이 저온장시간살균유와 고온단시간살균유 보다 저장성이 좋은 이유는 초고온순간살균유는 포자를 비롯한 모든 세균이 파괴되어 세균수가 매우 낮기 때문이다. 또한 본 연구에서 조사한 초고온순간살균유들은 2차 오염에 의해 저장성이 감소되는 경우가 매우 적은 것으로 보였다.

우유의 세균수를 측정하기 위하여 SPC 방법 대신에 PAC 방법을 사용할 수 있음을 알 수 있었다. PAC 방법에서 사용하는 Petrifilm은 표준평판한천배지의 영양 성분과 수용성인 겔 형성물질이 코팅된 바닥 필름이 있으며 겔 형성물질과 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride 지시약으로 코팅된 유연성 필름이 바닥 필름 위를 덮고 있다. 배양에 의하여 형성된 군락은 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride에 의해 적색을 띠게 되어 계수가 용이하였으며 한천배지와 페트리접시를 준비할 필요가 없어 편리하며 노동력을 절약할 수 있었다.

저온장시간살균유 B와 C 및 고온단시간살균유 F를 포함한 26개의 제품들을 7℃에서 5일간 저장한 후의 SPC와 10일간 저장한 후의 SPC의 상관계수가 0.68이었으며 1%의 유의 수준에서 고도의 유의성이 인정되었다(Fig 2). 5일간 저장한 후의 SPC가 10^4CFU/㎖ 이상으로 증가하였을 때에만 10일 저장 후의 SPC가 10^5-10^7CFU/㎖에 이르렀으며 5일간 저장한 후의 SPC가 10^2-10^4CFU/㎖이었을 때에는 10일 저장 후의 SPC를 예측하는 것이 불가능하였다. 제조 일에서의 SPC에 대한 5일 간 저장한 후의 SPC의 비율과 10일 저장 후의 SPC간의 상관계수는 0.73으로서 1%의 유의 수준에서 고도의 유의성을 보였다 (Fig 3). 그러나 대부분의 우유가 생산 일에서의 SPC와 5일가 저장한 후의 SPC간의 차이가 크지 않아 저장성을 예측하기가 쉽지 않음을 알 수 있었다. 생산일의 SPC에 대한 5일간 저장한 후의 SPC의 비율을 조사하여 우유의 저장성을 예측하는 Mosley 방법에 문제점이 있음을 알 수 있었다.

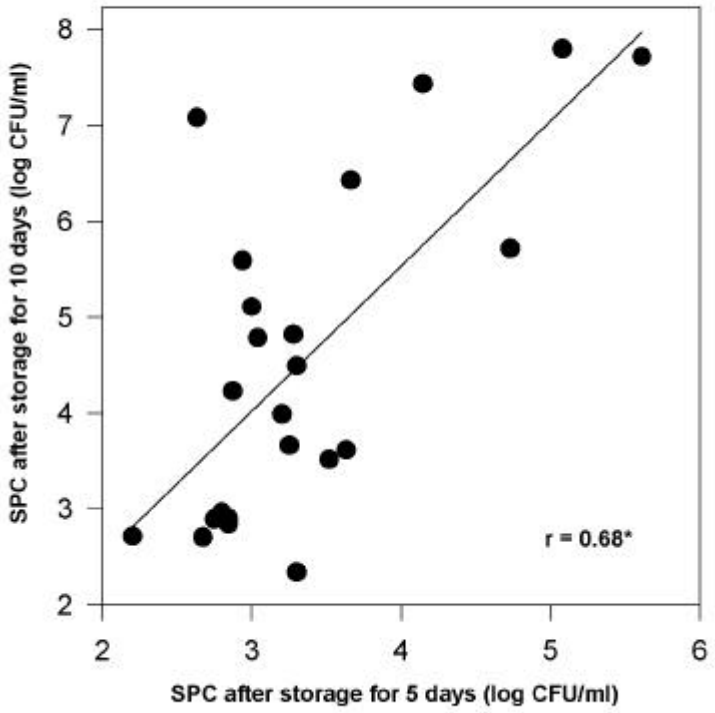


Fig. 2. Regression line of the standard plate counts of the milk stored for 5 days versus those of the milk stored for 10 days * $P<0.01$

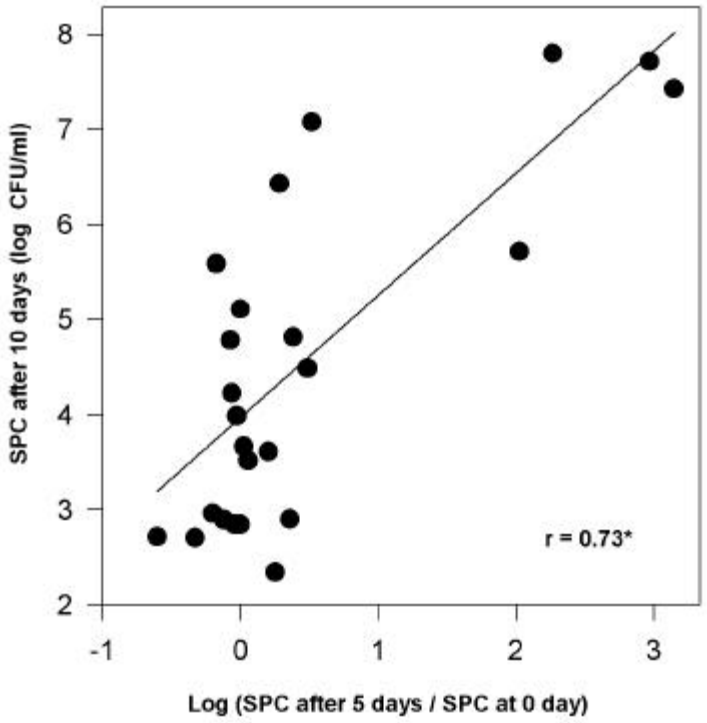


Fig. 3. Regression line of the ratio of the standard plate count of the milk stored for 5 days to those of milk at the production day versus the standard plate count of milk stored for 10 days * P<0.01

나. 시유의 저장 온도에 따른 세균수 변화

저온장시간살균유 C, 고온단시간살균유 F 및 초고온순간살균유 G를 7℃, 10℃, 13℃ 및 15℃ 저장온도에서 저장하여 세균수의 변화를 측정하였다(Table 2).

7℃에서 저장한 모든 시유는 10일까지 세균수가 법적 규격인 20,000CFU/㎖에 미달하여 2차 오염이 안된 우유로 확인하였다. 10℃에서 저장한 저온장시간살균유와 고온단시간살균유는 5일만에 18,000CFU/㎖과

79,000CFU/㎖에 각각 도달하여 법적 규격에 근접하거나 초과하였다. 반면에 초고온순간살균유는 10℃에서 세균수가 거의 증가하지 않아 저장성이 좋았다.

저온장시간살균유과 고온단시간살균유를 13℃에서 저장할 때에는 3일 후에 20,000CFU/㎖을 초과하며 5일 후에는 10^7CFU/㎖를 초과하여 이미 부패하였음을 알 수 있다. 그러나 초고온순간살균유는 13℃에서 3일 저장 후에 비교적 낮은 세균수를 보이고 있으며 5일 저장 후에는 10^6CFU/㎖을 초과하였다. 15℃에서는 저온장시간살균유와 고온단시간살균유는 3일 후에 10^7CFU/㎖ 이상이었으며 초고온순간살균유는 5일 후에 10^7CFU/㎖을 초과하였다.

저온장시간살균유와 고온단시간살균유에는 열처리에 의해 파괴가 되지 않는 포자 형성 세균인 내냉성 *Bacillus* 및 내열성 그람양성 세균이 7℃의 온도에서는 성장할 수 없으나 저장온도가 상승함에 따라 성장이 가능하게 되어 저장성이 감소될 수 있으나 초고온순간살균유에는 포자가 파괴되기 때문에 저장성이 우수한 것으로 생각된다(Varnam과 Sutherland, 1994).

Table 2. Changes of standard plate count of market milk stored at the different temperatures

Heat treatment (Plant)	Storage day	SPC (CFU/㎖)			
		7℃	10℃	13℃	15℃
LTLT (C)	0	2,900	2,900	1,300	2,900
	3	2,400	4,000	140,000	18,000,000
	5	3,300	79,000	32,000,000	21,000,000
	10	3,300	16,000,000	-	-
HTST (F)	0	1,700	1,700	290	1,700
	3	1,500	1,800	44,000	17,000,000
	5	1,600	18,000	12,000,000	42,000,000
	10	9,700	23,000,000	-	-
UHT (G)	0	4	4	0	0
	3	3	0	2,000	400
	5	0	0	1,700,000	32,000,000
	10	26	<2,500	-	-

이 결과로부터 초고온순간살균유는 10℃ 이하에서 저장이 가능하며 저온장시간살균유와 고온단시간살균유는 7℃ 이하에서 저장하여야 함을 알 수 있었다. 현재 식품공전에 의하면 0-10℃에서의 저장을 규정하고 있다. 과거에는 거의 모든 시유가 초고온순간살균유로서 생산되어 10℃에서 저장할 수 있었으나 저온장시간살균유와 고온단시간살균유가 생산되고 있는 현재에는 저장온도를 7℃이하로 규정을 개정할 필요가 있다. 소매점에서는 여름에 온도가 15℃ 이상까지도 올라갈 수 있는 개방형 냉장 전시대보다는 7℃ 이하에서 온도를 유지할 수 있는 냉장전시대를 사용하는 것이 바람직하다.

3. 시유의 가용성 유청단백질 함량

우유의 열처리 온도와 시간에 따라 유청단백질의 변성정도가 다르게 나타난다. 저온장시간살균법과 고온단시간살균법에 의해서는 유청단백질의 변성이 적게 일어나나 초고온순간처리법은 대부분의 유청단백질이 변성된다(Lewis, 1986). 따라서 유청단백질의 변성정도로부터 우유의 열 처리가 각 살균방법의 규정된 온도에서 이루어졌는가 추정할 수 있다.

시유의 540nm에서의 optical density와 가용성 유청단백질 함량을 측정하여 유청단백질의 변성여부를 결정하였다(Table 3). 540nm에서 측정한 optical density에서 모든 저온장시간살균유들과 고온단시간살균유 F는 0.146-0.196이었으며 모든 초고온순간살균유와 고온단시간살균유 D와 E는 0.29-0.49이었다. 모든 저온장시간살균유들과 고온단시간살균유 F 제품은 2.72 3.60㎎/㎖의 높은 가용성 유청단백질 함량을 나타냈으며 고온단시간살균유 D와 E 및 모든 초고온순간살균유들이 0.58 1.48㎎/㎖의 낮은 가용성 유청단백질 함량을 나타냈다.

이 실험 결과 모든 저온장시간살균유들과 고온단시간살균유 F에 가용성 유청단백질이 많이 함유하고 있음을 가리켰다. 반면에 초고온순간살균유와 고온단시간살균유 D와 E는 열처리에 의해 다량의 유청단백질이 변성되었음을 가리켰다.

각 시유를 SDS-PAGE(Fig 4)로 분석하여 유청단백질의 변성 여부를 조사하였다. 분자량이 18,362인 β-lactoglobulin과 분자량이 14,174인 α-lactalbumin의 단백질 band의 강도를 비교하면 저온장시간살균유 A, B 및 C와 고온단시간살균유 F는 이 단백질들이 강하게 보이나 고온단시간살균유 D와 E와 초고온순간살균유 G, H 및 I는 약했다.

Table 3. The soluble whey protein content of market milk

Heat treatment	Processing plants	Optical density at 540 nm	Soluble whey protein (mg/ml)
	A	0.147 ± 0.004	2.72 ± 0.07
LTLT	B	0.196 ± 0.014	3.60 ± 0.25
	C	0.185 ± 0.006	3.41 ± 0.11
	D	0.029 ± 0.003	0.58 ± 0.01
HTST	E	0.044 ± 0.016	0.84 ± 0.31
	F	0.146 ± 0.005	3.02 ± 0.10
	G	0.042 ± 0.002	0.82 ± 0.04

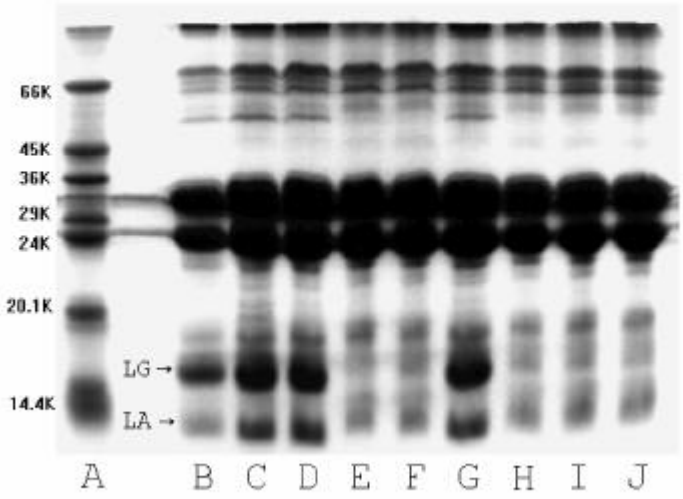


Fig. 4. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of market milk.

B, C, D: LTLT-pasteurized milk, E, F, G: HTST-pasteurized milk, H, I, J: UHT-pasteurized milk, A: marker proteins, LG: β-lactoglobulin, LA: α-lactalbumin. The numbers at left indicate molecular weights of marker proteins as described in Materials and Methods.

열처리에 의해 변성된 유청단백질은 유청단백질들간의 disulfide 결합과 유청단백질과 κ-casein간의 disulfide 결합에 의해 분자량이 큰 단백질중합체로 형성되어 13% polyacrylamide 전기영동 겔에 들어오지 못한다. 따라서 고온단시간살균유 D와 E와 초고온순간살균유 G, H 및 I의 유청단백질은 대부분 변성되었다. 있다.

이러한 결과들로부터 고온단시간살균유 D와 E가 고온단시간살균유 F보다 살균온도가 높으며 초고온순간살균유과 비슷한 열처리를 받은 시유인 것을 확인할 수 있었다. 이 제품들은 또한 가열취가 심하였으며 세균수도 초고온순간살균유와 같이 매우 낮아(Table 1) 열처리 공정에 문제점이 있음을 알 수 있었다. 이 시유들은 고온단시간살균유이기 때문에 고급제품으로서 판매되고 있으므로 72-75 ℃에서 15-20초간의 고온단시간살균법(한국식품공업협회, 1994)에 따라 살균되는가를 확인할 필요가

4. 적 요

열처리 방법과 저장 온도에 따른 저장 중의 시유의 세균수의 변화를 조사하였다. 시유의 가열 처리 조건을 추정하기 위하여 가용성 유청단백질의 함량과 SDS-PAGE 전기영동에서의 유청단백질들의 형태를 조사하였다. 저온장시간살균유 두 제품을 제외한 모든 시유의 세균수는 7 ℃에서 10일 동안의 저장 중에 유의성있게 증가하지 않았다. 저온장시간살균유 중의 한 제품은 생산 일의 평균 세균수가 29,000CFU/㎖이었으며 다른 저온장시간살균유는 10일 저장 후의 평균 세균수가 4.7×10^6CFU/㎖ 이었다. 5일간 저장 후의 세균수와 10일 저장한 후의 세균수간의 상관계수는 0.68이었으며 생산 일에서의 세균수에 대한 5일 저장후의 세균수의 비율과 10일 저장후의 세균수간의 상관계수는 0.73이었다. 저온장시간살균유와 고온단시간살균유는 10 ℃, 13 ℃, 및 15 ℃에서 10일간 저장할 때에 세균수가 10^6CFU/㎖ 이상으로 증가하였으나 7 ℃에서는 증가하지 않았다. 초고온순간살균유는 13 ℃와 15 ℃에서 10일간 저장할 때에 10^6CFU/㎖이상으로 증가하였으나 7 ℃와 10 ℃에서는 2,500CFU/㎖ 미만에 머물었다. 고온단시간살균유 중 2 제품은 가용성 유청단백질 함량과 SDS-PAGE에서 β-lactoglobulin과 α-lactbumin band의 강도가 초고온순간살균유와 유사하였다.

제 2 절 시유의 저장가능기간 예측을 위한 배양방법에 관한 연구

SUMMARY

The shelf life of market milk was correlated with the bacterial counts using different incubation methods which include standard plate counts(SPC) after storage at 7℃ for 5 days and 10 days and modified psychrotrophic bacterial counts(mPBC) after preliminary incubation at 21℃ for 18 hours with or without addition of dairy gram negative broth(DNGB). The correlation coefficients between shelf life and SPC after storage for 5 and 10 days were -0.71 and -0.80, respectively, which indicated that the activity of psychrotrophic bacteria in milk determined the shelf life during refrigerated storage. The correlation coefficients between shelf life and mPBC after preliminary incubation at 21℃ for 18 hours with and without addition of DGNB were -0.56 and -0.48, respectively. Dairy gram negative agar was better selective media for growth of gram negative bacteria than crystal violet tetrazolium agar and plate count agar containing 0.01% benzalkonium chloride. The results suggested that the rapid methods to predict the shelf life of market milk by using preliminary incubation method and mPBC should be improved.

(Key word : milk, bacterial count, shelf life, psychrotophic bacteria)

1. 서 론

시유가 살균(pasteurization)된 후 원유 또는 유가공기계로부터 2차오염이 일어날 수 있다. 2차오염된 시유가 냉장 저장될 때에 내냉성 세균이 증식하여 저장가능기간(shelf life)이 단축하게 된다. 적정한 온도와 시간으로 살균 처리되고 2차오염이 안된 우유는 45°F(7.2°C)에서 14일간 저장하는 동안에 최소한 50% 이상의 제품이 1/㎖ 미만의 대장균군수과 20,000/㎖ 미만의 세균수를 나타낸다고 한다(Barnard 등. 1995). 우유의 적절한 살균과 2차오염을 방지하는 유가공기계의 설계와 공정이 중요하고

우유의 2차오염 여부와 저장가능기간을 진단할 수 있는 신속측정법이 필요하다.

우유를 냉장 저장하면서 세균수를 측정하여 일정 기준이상을 초과하는 기간이나 불쾌취가 검출되는 기간을 저장가능기간(shelf life)으로 할 수 있다. McMeekin과 Ross(1996)는 제품 1㎖ 또는 1g 당 10^7에 도달하면 부패가 일어나기 시작하며 $10^{7.5}$에서 식품의 명백한 부패가 일어난다고 하였다. Bishop 등(1984)은 7℃ 이하에서 생장하는 세균들은 살균에 의해 파괴되므로 7℃를 우유의 저장가능기간을 결정하기 위한 온도로 사용할 수 있다고 하였으며 ADSA score card를 이용하여 냉장 저장된 우유의 관능검사를 실시하여 불쾌취가 검출된 바로 전날까지를 저장가능기간으로 결정하였다.

우유의 저장성을 신속히 예측하는 방법으로서 7℃에서 5일간 배양한 후의 세균수와 생산일의 신선한 우유의 세균수를 비교하여 저장성을 예측하는 Mosley 저장성검사(IDF, 1993; White 등, 1993)가 있다. 18℃ 또는 21℃에서 18시간 예비배양한 시유를 21℃에서 배양하여 전기저항 검출시간을 결정하는 방법이 있다 (Bishop 등, 1984). 우유에 dairy gram negative broth와 같은 그람음성세균 선택배지를 첨가하거나 또는 우유 자체를 21℃에서 18시간 예비 배양한 후 표준평판한천배지에 접종하여 21℃에서 25시간 배양하여 형성된 균락을 변형내냉성세균수(modified psychrotrophic bacterial count)을 계수 하는 방법이 있다(Byrne 등, 1989). 우유에 그람음성세균선택배지를 첨가하여 30℃에서 24시간 배양한 후 bioluminescence를 측정하여 증식되 내냉성 그람음성세균의 ATP의 양을 측정하는 방법이 있다(Wee와 Bossuyt, 1982). 이 방법들 중의 일부는 미국위생보건협회의 우유의 저장가능기간을 예측할 수 있는 신속측정법으로서 추천되고 있다(Byrne 등, 1989a; White 등, 1993).

본 연구는 국산 시유에 대한 저장성 신속측정법들과 관능검사에 결정된 저장가능기간과의 상관관계를 구하였으며 그람음성 선택배지들의 선택성을 조사하였다,

2. 재료 및 방법

가. 시유 제품

시유는 1개 대학부속유가공장과 2개 유가공업체에서 생산되는 제품을 구입하였으며 살균처리 방법에 따라 저온장시간살균유 2제품과 고온단시간살균유 1제품을 구입하였다. 생산일 또는 하루 전에 살균되어 대리점 또는 소매점에 도착된 우유를 당일에 구입하여 실험에 사용하였다.

나. 세균

생명공학연구소 유전자은행에서 구입한 균주는 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767, *Pseudomonas fragi* KCTC 2345, *Escherichia coli* KCTC 2441, *Enterococcus faecium* KCTC 3077, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928이며 한국종균협회에서 구입한 균주는 *Enterobacter aerogenes* KCCM 12177, *Aeromonas hydrophilia* KCCM 11533, *Bacillus subtilis* KCCM 11314, *Micrococcus luteus* KCCM 11326이다.

다. 시유의 저장 실험

시유 200㎖를 250㎖ 용량의 멸균된 메디아병에 옮겨 7℃에서 저장하였으며 5일과 10일에 세균수를 측정하였다. 표준평판세균수(SPC)의 측정은 희석된 시료를 standard method agar에 접종하여 32℃에서 48시간 배양하여 계수 하였다 (Marshall, 1993). 상관계수 r은 Sigmaplot (Jandel, USA)을 사용하여 계산하였다.

라. 시유의 예비배양에 의한 저장성 측정법

시유 50㎖를 100㎖ 용량의 멸균된 메디아병에 옮겨 21℃에서 18시간 배양하거나 또는 동량의 dairy gram negative broth(DGNB)를 혼합하여 21℃에서 18시간 배양하였다. 배양된 시유 또는 시유와 DGNB 혼합액의 내냉성세균수(modified psychrotrophic bacteria count)를 plate count agar에 접종하여 21℃에서 25시간 배양하여 형성된 집락을 계수하였다.

마. 관능검사

7℃에서 냉장된 우유를 제조당일로 부터 6일째에 시작하여 2 3일 간격으로 22일째까지 관능검사를 실시하였으며 일정량의 우유를 실온에서 30분간 방치한 후에 3명의 훈련된 관능검사원이 ADSA scoring guide에 따라 관능검사를 실시하였다. 각 향미의 점수들중에서 하나라도 3점이 되는 관능검사일의 전날을 저장가능기간(shelf life)으로 결정하였다(Bishop 등, 1984, Bodyfelt 등, 1988).

바. 그람음성 선택성 한천배지에서의 세균의 생장

그람음성 선택성 한천배지로서 Dairy gram negative agar, Crystal

violet tetrazolium agar (Marshall, 1993), 0.01% benzalkonium chloride를 함유하는 plate count agar를 사용하였다. Trypticase soy broth에 접종하여 32℃에서 24시간 배양한 세균들을 각 agar에 streaking 하여 21℃와 30℃에서 24시간 배양하여 집락의 형성을 조사하였다.

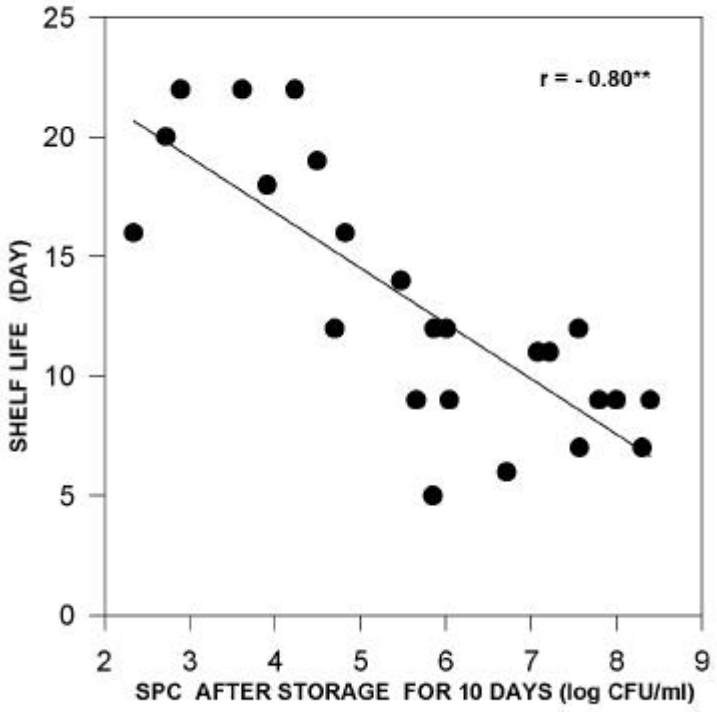


Fig 1. Scattergram of the linear relationships of shelf life and standard plate count after storage for 10 days ** P<0.01

3. 결과 및 고찰

가. 저장기간중의 세균수와 저장가능기간과의 상관관계

국내에서 판매되고 있는 저온장시간살균유 2제품과 고온단시간살균유 1제품 구입하여 7℃에서 저장하며 5일과 10일 후에 표준평판법으로 측정

한 세균수들과 관능검사에 의해 결정된 저장가능기간과의 상관관계를 조사하였다. 저장 5일과 10일 후의 세균수와 저장가능기간간의 선형회귀계

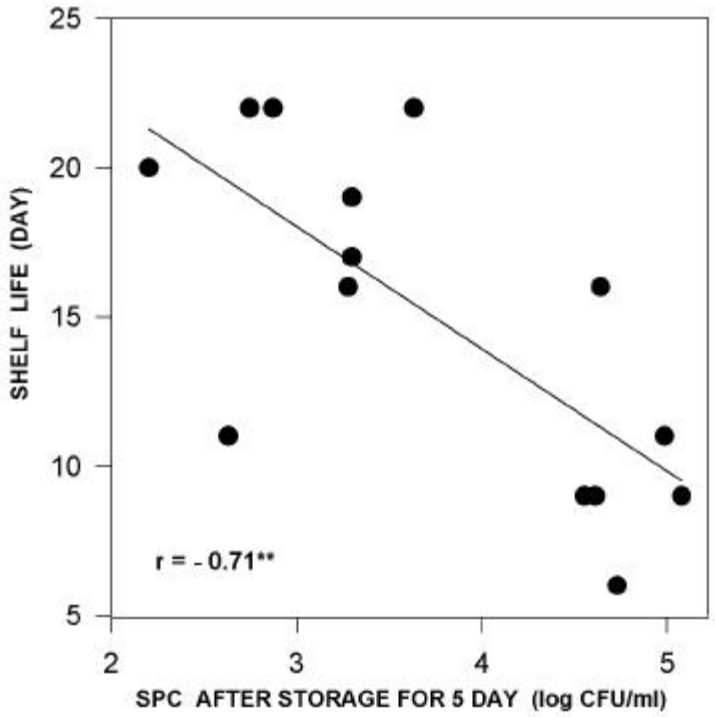


Fig. 2. Scattergram of the linear relationships of shelf life and standard plate count after storage for 5 days. ** P<0.01

저장 10일 후의 세균수와 저장가능기간간의 상관관계가 매우 높음을 알 수 있었다. 일반적으로 2차오염된 우유내의 내냉성세균의 증식이 저장초기에는 검출하기 어려우나 일반적으로 저장 10일경에 10^5CFU/㎖ 이상으로 증식하였으며 저장가능기간이 10 12일 이하 이었다. 반면에 10일 저장 후에 세균수가 10^4CFU/㎖ 이하로 유지되면 저장가능기간이 15일 이상으로서 23일에도 이취가 발생하지 않는 시유도 있었다. 반면에 저장 5일 후의 세균수와 저장가능기간과의 상관관계는 상대적으로 낮았으며 이는 2차오염된 시유의 내냉성세균수가 적기 때문에 5일간의 저장동안에는 세균

의 생장이 불충분하여 2차오염된 시유와 오염안된 시유간에 세균수의 차이가 작으므로 상관관계가 낮은 것으로 사려된다.

나. 그람음성세균 선택성 한천배지에서의 세균의 생장

Dairy gram negative agar, crystal violet tetrazolium agar 및 0.01%의 bezalkonium chloride를 함유하는 plate count agar(BCPCA)에서 4종류의 그람양성세균과 5종류의 그람음성세균들의 생장 여부을 조사하였다(Table 1). 각 한천배지에서의 각 세균의 생장 반응은 21℃와 30℃의 두 배양온도에서 차이가 없었다. BCPCA에서는 *Enterobacter aerogenes*와 *Pseudomonas fragi*가 성장할 뿐 그람양성세균 뿐만 아니라 다른 그람음성세균들은 생장하지 못하였으며 Crystal violet tetrazolium agar에서는 *Aeromonas hydrophilia*를 제외한 그람음성세균이 생장하였으며 그람양성세균 중에서 *Enterococcus faecium*이 생장하였다. Dairy gram-negative agar에서는 *Aeromonas hydrophilia*를 제외한 그람음성세균이 생장하였으며 그람양성세균은 생장하지 못하였다.

Table 1. Growth of bacteria on selective agar for gram negative bacteria

Bacteria	Gram stain	Dairy gram negative agar	Crystal violet tetrazolium agar	BCPCA
Bacillus subtilis	+	-	-	-
Staphylococcus aureus	+	-	-	-
Enterococcus faecium	+	-	+	-
Micrococcus luteus	+	-	-	-
Escherichia coli	-	+	+	-
E. aerogenes	-	+	+	+
Pseudomonas fluorescens	-	+	+	-
Pseudomonas fragi	-	+	+	+
Aeromonas hydrophilia	-	-	-	-

본 연구에서 조사한 그람음성세균 선택성 한천배지들 중에서 Dairy gram negative agar가 그람음성세균에 대해 특이성이 높았던 반면에 BCPCA는 일부 그람음성세균을 억제하고 crystal violet tetrazoilum agar

는 일부 그람양성세균의 생장을 허용하였다. 한편 benzalkonium chloride가 시유에 첨가되면 시유의 지방이 유리되어 버터입자가 형성되어 불균일한 시료 용액이 되는 단점이 있었다.

억제제들을 배지 또는 시유에 첨가하여 그람음성세균들을 선택적으로 생장하게 하는 연구들이 진행되어왔다. Byrne 등(1989b)에 의하면 0.1%의 benzalkonium chloride를 첨가된 우유에서 그람양성세균들의 성장이 억제되고 그람음성세균들은 생장된다고 보고하였으며 benzalkonium chloride가 crystal violet 및 alkyl sulphonate 보다 그람음성세균의 선택적 배양을 위해 더 우수한 억제제라고 제안하였다. Visser와 de Groote(1984)는 0.001 0.003%의 benzalkonium chloride를 첨가한 plate count agar에 전 배양된 시유를 접종하여 30℃에서 24시간 배양하여 그람음성세균에 의한 재오염여부를 결정할 수 있었다. 본 연구에서는 0.01%의 benzalkonium chloride을 첨가된 plate count agar에서 일부 그람음성세균의 생장이 억제되는 결과를 보였으며 이는 억제제의 농도가 높았기 때문인 것으로 생각된다.

다. 예비배양 후의 내냉성세균수와 저장가능기간의 상관관계

시유를 21℃에서 18시간 배양한 후에 측정한 내냉성세균수와 저장가능기간간의 선형회귀계수는 -0.48이었다. 따라서 예비배양후의 내냉성세균수가 저장가능기간과 매우 낮은 상관관계를 가짐을 알수 있었다(Fig. 3). 21℃에서 18시간 예비배양할 때에 생장하는 내냉성세균과 7℃에서 저장할 때에 생장하는 세균들의 종류가 달라 일어나는 결과이라고 할 수 있다. 다시 말하면 21℃에서 배양할 때에 주로 활발히 생장하는 세균이 그람음성 내냉성세균이외에 살균처리에 의해 활성화된 포자형성세균인 *Bacillus*가 있는 반면에 7℃에서는 그람음성 내냉성세균만이 성장이 가능하기 때문이다(Bishop과 White, 1986). 또한 21℃에서 18시간 배양 후의 세균수는 시유가 생산될 때의 세균수의 영향을 받을 수 있으며 이 연구에서 조사한 시유제품들이 각각 다른 공장에서 다른 살균처리법으로 가공되었기 때문일 수 있다.

이 방법들은 미국공중위생협회의 유제품분석표준방법에(White 등, 1993) 실려있으나 공동연구에 의해 검증이 되지 못하였다. 예비배양 후의 세균수가 1,000CFU/㎖ 미만 일때에 14일 이상의 저장가능기간이며 200,000CFU/㎖ 보다 클때에는 저장가능기간이 9일 이하이 된다고 한다. 그러나 본 실험에 의하면 이를 확인할 수가 없었다. 이 방법이 표준방법으로서 사용되기에는 더 많은 공동연구가 필요하다.

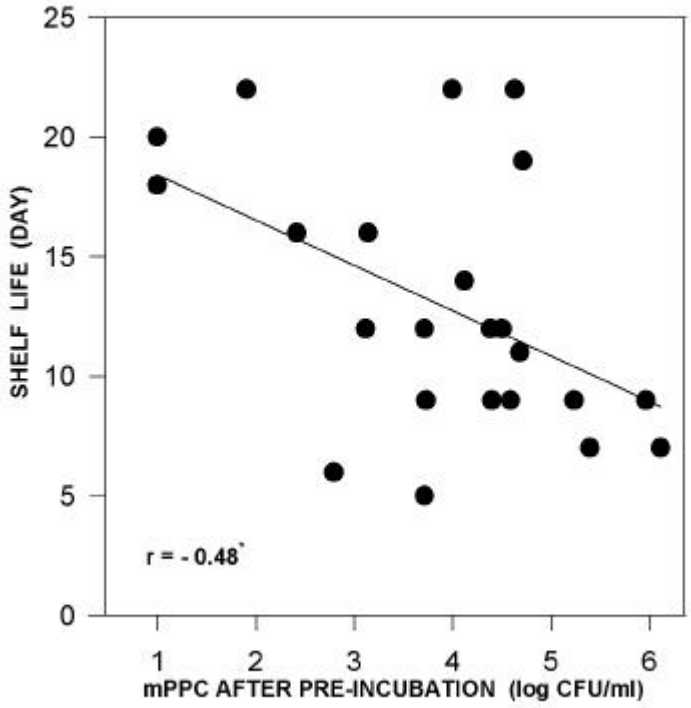


Fig. 3. Scattergram of the linear relationship of shelf life and modified psychrotrophic plate count after preliminary incubation at 21℃ for 18 hours. * P<0.05

시유를 동량의 dairy gram negative broth(DGNB)와 섞어 21℃에서 18시간 배양한 후의 내냉성세균수와 저장가능기간과의 선형상관계수가 -0.56이었다(P<0.05)(Fig. 4). 이 방법은 그람음성 세균에 대해 선택성인 배지인 DGNB를 사용하여 2차오염된 그람음성 내냉성세균만을 검출하는 방법으로서 시유만을 예비배양하는 앞의 방법보다 상관관계가 약간 더 높았으나 신뢰성이 있는 품질관리방법으로 이용하기에는 불충분하였다. 우유에 오염된 그람음성 내냉성세균수가 낮아 21℃에서 18시간의 배양 동안에 충분히 생장하여 세균수가 내냉성세균수가 높게 나타나지 않았기 때문인 것으로 사료된다.

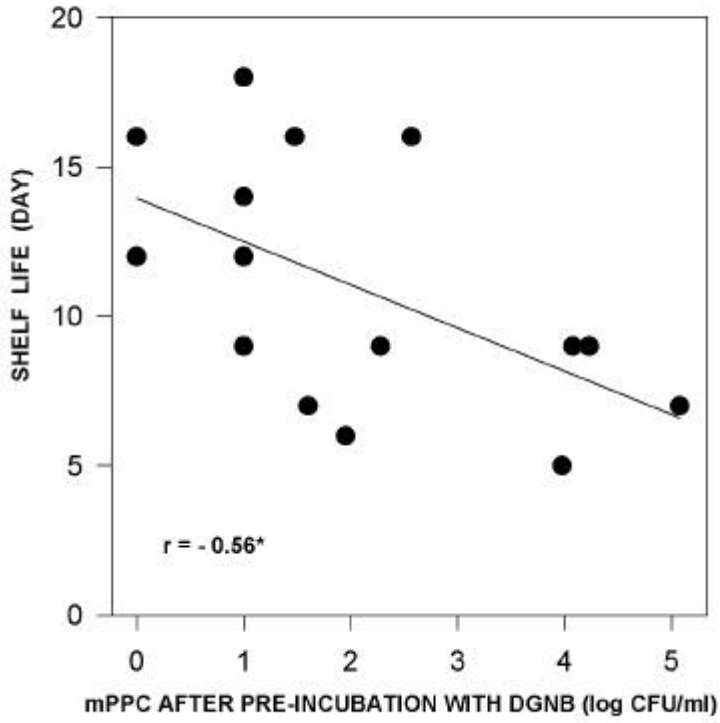


Fig. 4. Scattergram of the linear relationship of shelf life and modified psychrotrophic plate count after preliminary incubation with dairy gram negative broth at 21℃ for 18 hours. *P<0.05

시유를 비교적 낮은 온도(18 25℃)에서 예비배양하여 2차오염된 내냉성세균의 성장을 촉진시킨 후 내냉성세균수를 측정하므로써 시유가 위생적으로 세척되고 정상적으로 가동되는 기계에 의해 가공되고 있는가를 결정할 수 있다. 또한 예비배양방법은 시유의 잠재적 저장가능기간을 예측할 수 있게 한다. Bishop과 White(1985)는 시유를 21℃에서 14시간 예비배양한 후 측정한 내냉성세균수와 저장가능기간의 회귀계수가 -0.814이라고 보고하였다.

그러나 이러한 예비배양조건에서는 포자를 형성하거난 내열성이 높아 살균조건에서 살아남는 그람양성세균도 생장할 수 있으므로 시유에 억제

제를 첨가하여 그람양성세균의 생장을 억제하므로서 2차오염된 그람음성 세균만을 선택적으로 생장하게 하여 시유의 위생적 처리 여부와 저장가능 기간을 더 정확히 측정할 수 있다. Byrne 등(1989a)는 0.1% benzalkonium chloride를 첨가하여 예비배양한 시유의 그람음성 내냉성세균수와 저장가능기간간의 이차회귀계수는 -0.84이고 시유에 동량의 dairy gram negative broth를 첨가하여 21℃에서 18시간 배양한 후 측정한 그람음성 내냉성세균수와 저장가능기간간의 이차회귀계수가 -0.88이었다. 본 연구는 이와 같이 높은 회귀계수를 얻지 못한 이유는 사용된 시유중에서 2차 오염된 시유의 비율이 상대적으로 적고 오염도가 낮아서 저장기간이 짧은 시유가 적었다. 그러나 조사대상 3개 유가공장 중에서 1개 유가공장의 제품들이 지속적으로 2차오염되었음을 예비배양방법을 통한 내냉성세균수를 측정하므로서 검출할 수 있었다.

4. 적 요

시유를 7℃에서 5일 또는 10일간 저장한 후의 세균수, 21℃에서 18시간 예비배양한 후의 내냉성세균수, 및 동량의 Dairy gram negative broth(DGNB)와 혼합하여 21℃에서 18시간 예비배양한 후의 그람음성 내냉성세균수와 저장가능기간과의 상관관계를 조사하였다. 시유를 5일 또는 10일간 저장한 후의 세균수와 저장가능기간간의 선형상관계수는 각각 -0.71과 -0.81이었다($P<0.01$). 21℃에서 18시간 예비배양된 시유의 내냉성세균수과 시유에 동량의 DGNB를 첨가하여 21℃에서 18시간 예비배양한 배양액의 세균수에 대한 시유의 저장가능기간의 선형상관계수는 각각 -0.48과 -0.56이었다($P<0.05$). Dairy gram negative agar는 crystal violet tetrazolium agar와 0.01% benzalkonium chloride를 함유하는 plate count agar 보다 그람음성세균에 대해 선택성이 높았다. 이러한 결과들은 우유에 오염된 내냉성세균의 활성이 우유의 저장성에 대한 영향력이 크다는 것과 예비배양방법을 이용한 시유의 신속저장성측정법들은 저장가능기간과 어느 정도의 상관관계가 있었지만 개선할 필요가 있음을 알 수 있었다.

제 3 절 ATP Bioluminescence와 전기저항법을 이용한 시유의 2차오염 검출법에 관한 연구

SUMMARY

ATP bioluminescence method and impedance method were investigated to detect post-pasteurization contamination of market milk. ATP bioluminescence method showed that tryptone glucose yeast extract broth containing benzalkonium chloride inhibited growth of *Pseudomonas fluorescens* as well as gram positive bacteria and that dairy gram negative(DGN) broth and TGY broth containing crystal violet inhibited growth of gram positive bacteria only. The bacterial counts after storage at 7℃ for 10 days of most LTLT-pasteurized market milk from plant A were more than 10^6 CFU/㎖, which indicated post-pasteurization contamination. The ATP bioluminescence values after preliminary incubation at 30℃ were higher than that at 25℃. There was not consistent relationship between the ATP bioluminescence values after preliminary incubation with DGN broth and the bacterial counts after storage at 7℃ for 10 days. Impedance method showed that addition of CFC broth to skim milk culture resulted in growth of *Pseudomonas* and *Enterobacter aerogenes*. Addition of DGN broth to skim milk culture allowed growth of *Enterococcus faecalis* and *S. aureus* as well as gram negative bacteria.. Addition of Pseudosel broth inhibited growth of gram positive bacteria but not gram negative bacteria. Impedance method using tryptcase soy broth containing sodium desoxycholate and cetrimide enabled detection of post-pasteurization contamination of LTLT-pasteurizaed milk but not UHT-pasteurized milk.

(Key Words : Market milk, Post-pasteurization contamination, Gram negative bacteria, Psychrotrophic bacteria, ATP bioluminescence, Impedance method)

I. 서 론

열처리에 의하여 살균된 시유가 원유 또는 충전기와 같은 유가공기계

에 의하여 미생물의 오염되는 것을 살균후 오염(post-pasteurization contamination)이라 하며 식품공전(한국식품공업협회, 1994)에서 2차오염으로 규정되어 있다. 식품공전에 의하면 우유류의 제조·가공기준으로서 '살균제품은 미생물의 2차오염이 방지되도록 자동포장 공정으로 충전되어야 하며 ---'라고 규정되어 있다.

2차오염에 의해 유입된 내냉성 그람음성세균은 시유의 저장성을 단축시킬 수 있다. 또한 *Salmonella* 및 *Listeria*와 같은 병원균에 의해 시유 또는 유제품이 2차오염이 되면 식중독을 일으켜 공중위생의 위해 요인이 될 수 있다. 실제로 오염된 시유에 의해 salmonellosis가 미국 Illinois 주에서 일어나 16,000명의 식중독 환자가 감염된바 있다(Phillips와 Griffiths, 1989). 국내에서도 대형 유가공장이 발달하여 한 유가공장에서 공급받는 소비자의 수는 매우 많으며 계층이 다양하다. 또한 근래에는 시유의 유통환경이 복잡해지고 제품 용량도 대형화되어 소비자가 제품을 보관하는 기간이 장기화되고 있어 시유의 저장성은 더욱 중요하게 되었다. 시유의 가공 공정이 과학적이고 위생적이어야 하며 미생물학적 품질관리를 엄격히 유지하여야 한다. 특히 시유의 2차오염을 방지하여야 하며 2차오염을 신속히 검출할 수 있는 방법을 도입하여야할 것이다. 시유의 미생물학적 품질과 2차오염의 신속한 검출법에 대한 많은 연구들에 대하여 토론된 바가 있다(Vasavada, 1993; White, 1993; IDF, 1993; Bishop과 White, 1986).

시유의 저장성을 단축시키는 세균은 *Pseudomonas*와 그외에 많은 그람음성세균인 것으로 알려져 있다(IDF, 1993; Phillips 등, 1981; Gyllenberg 등, 1960). 원유의 미생물학적 품질을 측정하는 표준평판세균수, 내냉성세균수 및 대장균군수는 시유의 2차오염을 검출함에 있어 쓸모가 없다. 미국공중위생협회에서는 시유를 21℃에서 18시간 예비배양하여 내냉성세균의 성장을 촉진한 후에 plate count agar에 섞어 21℃에서 25시간 배양하여 modified psychrotrophic bacteria count(mPBC)를 계수하여 시유의 저장성을 측정하는 방법을 제안하였다(White 등, 1993). 그러나 이 방법은 예비배양중에 2차오염에 의한 내냉성 그람음성세균 뿐만 아니라 포자를 형성하는 *Bacillus*와 같은 내냉성 세균이 성장할 가능성이 있어 정상적으로 가공되고 냉장온도(7℃)에서 저장성이 좋은 시유도 높은 mPBC를 보여 저장성이 낮은 것으로 그릇되게 판정될 가능성이 있다. 이를 방지하기 위하여 적절한 그람음성세균 선택성 배지를 우유에 첨가하여 예비배양하므로서 2차오염 여부와 저장성을 정확하게 판정할 수 있다.

예비배양에 의해 성장한 세균을 한천배지에서 배양하여 형성된 집락을 계수하는 전통적인 세균수 측정법은 장시간의 배양시간을 요구하여 신속성이 떨어지며 노동력과 시약의 요구량이 크므로 품질관리 방법으로서 적

절하지 못하다. 간편하고 신속한 생균수의 측정법으로서 ATP bioluminescnece 방법 및 전기저항법이 있다. ATP bioluminescence 방법은 원유의 세균수 뿐만 아니라 시유의 2차오염 여부를 측정함에 응용되었다(Griffiths, 1993). 시유의 2차오염 여부를 검출하기 위하여 내냉성 그람음성세균의 성장이 유리하도록 Benzalkon A, crystal violet, nisin, 및 penicillin과 같은 그람양성세균의 억제제를 첨가하여 시유를 배양한 후에 ATP를 측정하는 방법들이 개발되었다 (IDF, 1993; Baustista 등, 1992; Phillips와 Griffiths, 1985; Wies와 Bossuyt, 1981; Wies와 Bossuyt, 1982). 이 연구들에서 억제제의 종류 및 배양온도와 시간을 조절하여 최적의 2차오염 검출 조건을 연구하였다.

ATP bioluminescence 방법은 민감도가 낮아 10^6CFU/㎖ 이상의 세균수를 가진 우유를 검출할 수 있었다(Bossuyt, 1982). 민감도를 높이기 위하여 비세균성 ATP를 제거하고 세균을 선택적으로 농축하기 위하여 nylon filter를 이용하는 방법이 개발되었다(Reybroeck과 Schram, 1995). 이 방법은 10^4CFU/㎖의 세균수까지 검출할 수 있도록 민감도가 개선되었다(Reybroeck과 Schram, 1995; Baustista 등, 1992).

배지에 우유를 첨가하고 Bactometer에서 배양을 시작한 후 배지의 전기 저항의 급격히 상승을 시작하는 시간을 detection time(DT)이라 한다. 세균이 적은 우유는 DT가 크고 세균이 많은 우유는 그 반대다. 이러한 전기저항법 (Bishop 등, 1984; Bossuyt와 Wies, 1983, Visser와 de Groote, 1984)을 이용하여 Byrne 등 (1989a)은 benzalkonium chloride를 첨가한 nutrient broth 또는 dairy gram negative(DGN) 배지를 우유에 섞어 21℃에서 18시간 예비배양한 후에 전기저항법으로 측정한 DT가 우유의 저장성과 높은 상관관계를 보였다.

본 연구는 그람양성세균과 그람음성세균이 접종된 탈지유 또는 시유에 그람음성 선택성 배지를 첨가하여 배양하여 ATP bioluminescence 방법과 전기저항법으로 세균의 성장여부를 결정하여 배지의 선택성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시유 시료

저온장시간 살균시유 A와 B 그리고 고온단시간 살균시유 C는 각기 다른 유가공장에서 1998년 2월부터 7월중에 생산된 제품으로서 생산일 또는 생산 1일 후에 구입하여 실험에 사용하였다. 각 시료는 다양한 용량의 용기

에 충전된 제품들이었다.

나. 세균 균주

본 실험에 사용한 균주 중 *Lactococcus* sp.는 Chr. Hansen's사(Denmark)의 치즈 스타터(R-703)로부터 분리하였으며 다른 세균은 생명공학연구소 유전자은행으로부터 구입하였다 (Table 1). *Pseudomonas* 균주들은 26℃에서 그외 다른 세균들은 30℃에서 24시간 동안 2회 계대 배양한 후 배양에 사용하였다.

Table 1. Bacteria used in the study

균주	Sources
Bacillus cereus	KCTC 1013
Bacillus circulans	KCTC 3347
Staphylococcus aureus	KCTC 1928
Enterococcus faecalis	KCTC 3512
Lactococcus sp.	Chr. Hansen's R-703
Escherichia coli	KCTC 2441
Klebsiella pneumoniae	KCTC 2001
Enterobacter aerogenes	KCTC 2190
Flavobacterium sp.	KCTC 2480
Pseudomonas fluorescens	KCTC 2344
Pseudomonas fluorescens	KCTC 1767
Pseudomonas putida	KCTC 1644

다. 배지의 조성 및 제조

LB배지의 조성은 tryptone(10g/ ℓ), yeast extract(5g/ ℓ), NaCl(10g/ ℓ)이며 TGY 배지의 조성은 tryptone(5g/ ℓ), yeast extract(2.5g/ ℓ), glucose(1g/ ℓ)이며 Dairy gram negative(DGN) 배지(Byrne 등, 1989b)는 tryptone(20.0g/ ℓ), yeast extract(20.0g/ ℓ), dextrose(4.0g/ ℓ), sodium desoxycholate (0.5g/ ℓ), 및 crystal violet(0.0001g/ ℓ)를 증류수에 용해한후 121℃에서 15분간 autoclave하였다. CFC 배지(Atlas와

Parks, 1993; Mead, 1985)는 peptone(16.0g/ ℓ), tryptone(10.0g/ ℓ), K_2SO_4(10.0g/ ℓ), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$(1.4g/ ℓ) 및 glycerol(10.0㎖/ ℓ)를 증류수에 용해하여 121℃에서 15분간 autoclave한 후에 10㎖의 막여과하여 멸균한 CFC 선택성 시약 용액(cephaloridine(5g/ ℓ), fucidine(1g/ ℓ), cetrimide(1g/ ℓ)을 첨가하여 제조하였다. Pseudosel 배지(Atlas와 Parks, 1993)는 peptone(20.0g/ ℓ), K_2SO_4(10.0g/ ℓ), $MgCl_2$(1.4g/ ℓ), cetrimide(0.15g/ ℓ) 및 glycerol(10.0㎖/ ℓ)을 용해하여 118℃에서 15분간 autoclave하였다. CP배지는 Pseudosel 배지에서 cetrimide를 제외한 나머지 성분으로 제조하였다.

라. ATP bioluminescence 방법

LB 배지에서 24시간 3회 계대 배양한 세균을 McFarland nephelometer을 사용하여 LB 배지에서 희석하여 20㎖의 탈지우유(Difco)에 20㎕의 세균 희석액을 첨가하여 세균수가 10^3CFU/㎖이 되게 하였다. 동량의 그람음성세균 선택성 배지들을 DGN 배지, 0.1% benzalkonium chloride를 첨가한 TGY 배지(BC-TGY) 또는 0.002% crystal violet을 함유한 TGY 배지(CV-TGY))를 혼합하고(Byrne 등 1989b) 25℃와 30℃에서 18시간 배양한 후에 ATP를 측정하였다.

시유 50㎖에 동량의 DGNB를 혼합한 후 25℃ 또는 30℃에서 18시간 예비배양한 후에 ATP를 측정하였다

ATP는 Reybroeck와 Schram(1995)의 방법에 따라 실시하였다. 온도조절이 되는 Biofiltration system(Lumac)에 nylon filter를 장착한 후 300㎕의 우유시료와 300㎕의 L-NRS용액(비이온성유화용액)을 가하여 4분간 반응시켰다. 진공펌프로 혼합액을 nylon filter로 통과시켜 세균을 농축시켰다. 600㎕의 quarter strength Ringer solution으로 nylon filter를 세척한 후에 밑면이 평편한 cuvette에 옮긴 후 Biocounter M2500 (Lumac)에 장착하였다. 200㎕의 NRM 용액(세균추출액)이 자동적으로 가하여지고 30초 후에 100㎕의 luciferin과 luciferase(Lumit-QM)가 첨가되었다. Luminescence가 10초 동안 누적 측정되어 상대적 광도(relative light intensity)로 기록되었다.

마. 전기저항법

TGY 배지에서 계대 배양된 세균을 멸균된 PBS 용액에 McFarland nephlometer를 사용하여 희석하여 10^3 CFU/㎖가 되게 탈지유(5㎖)에 접종하였다. 접종된 탈지유에 동량의 DGN 배지, CFC 배지, Pseudosel 배지 및

cetrimide를 뺀 Pseudosel(CP) 배지을 각각 동량 혼합하여 18℃, 21℃, 25℃ 및 30℃에서 각각 18시간 배양한 후 전기저항법으로 DT를 측정하였다.

시유 50㎖에 sodium desoxycholate(0.5g/ ℓ)와 cetrimide(0.15g/ ℓ)를 함유하는 Trypticase soy broth(Difco)(SC-TSB)을 동량 첨가하여 예비배양한 후에 전기저항법으로 DT를 측정하였다.

500㎕의 MPCA 한천배지(bioMerieux)가 있는 module well에 200㎕의 배양액을 넣어 21℃, 25℃ 및 30℃ 배양온도의 Bactometer processing unit (Bactometer Model 128, bioMerieux Vitek, Inc.)에 장착하여 detection time(DT)을 측정하였다.

바. 시유의 저장성 검사

멸균된 250㎖ 용량의 media병에 200㎖의 시유를 옮겨넣어 7℃에서 10일간 저장한 후에 표준평판법으로 계수하였다.

사. 변형내냉성세균평판법 (mPBC)

배양액의 내냉성세균수는 변형내냉성세균평판법에 따라 시료를 십진법으로 인산염 용액에 희석한 후 1㎖의 시료를 45℃로 냉각된 plate count agar에 섞어 접종하여 식힌 후 21℃에서 48시간 동안 배양한 후에 형성된 집락수를 측정하였다(Marshall, 1993).

3. 결과 및 고찰

가. ATP bioluminescence를 이용한 그람음성세균 선택배지의 비교

DGN 배지, BC-TGY 배지 및 CV-TGY 배지를 세균이 접종된 탈지유와 혼합하여 25℃ 또는 30℃에서 18시간 배양한 후 배양액의 ATP bioluminescence를 측정하였다(Table 2). DGN 배지와 CV-TGY 배지를 섞어 배양한 경우 *P. fluorescens*, *E. aerogenes* 및 *E. coli*의 ATP bioluminescence 측정치가 높았다. BC-TGY 배지에서 그람음성세균의 성장이 억제되었으며 *P. fluorescenes*는 모든 온도에서 성장하지 못하였다. DGN 배지와 CV-TGY 배지가 첨가된 경우에 *P. fluorescens*와 *E. coli*는 25℃ 보다 30℃에서 성장이 더 활발하였으나 *E. aerogenes*는 30℃ 보다 25℃에서 성장이 활발하였다. DGN 배지에서는 *S. aureus*와 *B. cereus*가 3

0℃에서 약하게 성장하며 CV-TGY에서는 *B. cereus*가 약하게 성장하였다 (Table 2). 이상의 결과에서 DGN 배지와 CV-TGY 배지는 상호간에 큰 차이를 보이지 않았으며 BC-TGY 배지에 비해 상대적으로 우수한 그람음성세균 선택성 배지이었으나 *P. fluorescens*의 성장은 활발하지 못하였다.

Table 2. ATP bioluminescence determination of bacterial culture in the mixture of selective broth and skim milk.

(Unit : relative light unit)

Bacteria	DGN broth		BC-TGY broth		CV-TGY broth	
	25℃	30℃	25℃	30℃	25℃	30℃
P. fluorescens	880	12,000	68	40	400	12,000
E. aerogenes	180,000	14,000	450	6,500	210,000	76,000
E. coli	69,000	76,000	1,500	40,000	35,000	75,000
B. cereus	53	810	430	40	290	930
S. aureus	48	940	55	41	77	170

나. 변형내냉성세균평판법과 ATP bioluminescence 방법를 이용한 시유의 검사

시유의 표준평판세균수가 10^6CFU/㎖이상이면 부패가 일어나기 시작하고 있으며 10^7CFU/㎖이상이 되면 이취가 검출될 수 있는 세균수이다 (McMeekin과 Ross, 1996). 7℃에서 10일간 저장한 후에 10^6CFU/㎖이상으로 세균수가 증가한 시유는 열처리와 가공 중에 내냉성세균의 2차오염 때문이다. 따라서 7℃에서 10일간 저장한 후의 표준평판세균수(SPC10d)가 10^6CFU/㎖ 이상인 유가공장 A의 시유 제품들은 내냉성세균에 의해 2차오염 되었다고 판정을 내릴 수 있다(Table 3).

Table 3에서 사용한 시유의 2차오염 여부를 신속히 검출하는 방법들로서 첫 번째로 시유를 21℃에서 18시간 예비배양한 후에 mPBC를 측정하는 방법(PI-mPBC)이다. 두 번째로 시유를 동량의 DGN 배지와 혼합하여 21℃에서 18시간 배양한 후에 mPBC를 측정하는 방법(DGN-mPBC)이다. 세 번째로 시유를 동량의 DGN 배지와 혼합하여 25℃에서 18시간 배양한 후에 ATP bioluminescence를 측정하는 방법(DGN25-ATP)이다. 네 번째로 시유를 동량의 DGN 배지와 혼합하여 30℃에서 18시간 배양한 후에 ATP bioluminescence를 측정하는 방법(DGN30-ATP)이다.

Table 3. Detection of post-pasteurization contamination of market milk by using modified psychrotrophic bacterial count (mPBC) and ATP-bioluminescence.

Plant	PI-mPBC[1] (CFU/㎖)	DGN-mPBC[1] (CFU/㎖)	DGN25-ATP[1] (RLU)	DGN30-ATP[1] (RLU)	SPC10d (CFU/㎖)
A	620	90	580	nd[2]	5,200,000
A	72,000	22,000	640	11,000	63,000,000
A	<10	<1	270	240	520
A	5,400	190	230	3,900	1,100,000
A	5,200	9,500	1,500	8,700	700,000
A	250,000	40	170	17,000	37,000,000
A	1,300	<10	290	320	36,000,000
A	1,300,000	120,000	140,000	33,000	20,000,000
A	<10	<10	230	250	8,000
A	920,000	17,000	220	370	25,000,000
A	25,000	12,000	290	110,000	10,000,000
A	nd	456,000	46,000	81,000	40,000
A	nd	490	490	13.000	11,000
A	nd	<10	270	310	2,800
A	nd	7,800	59,000	13,000	4,300,000
B	80	<1	310	230	780
B	9,900	<1	320	220	4,100
B	230	30	240	nd	220
C	1,400	<1	250	nd	66,000
C	52,000	<1	380	270	31,000
C	43,000	<1	320	270	17,000
C	13,000	<10	150	220	300,000
C	24,000	<10	80	180	50,000
C	32,000	<10	220	190	720,000
C	39,000	<10	190	270	450,000

1, Refer to Results and discussion

2, Not determined

유가공장 A의 제품 3과 9는 PI-mPBC법에서 세균수가 10CFU/㎖ 이하였으며 SPC10d가 또한 10,000CFU/㎖ 이하였다. PI-mPBC가 높은 다른 제품들은 SPC10d가 매우 높았다. 이는 PI-mPBC 방법이 2차오염의 검출법으로 사용할 수 있음을 보였다.

유가공장 A의 시유 제품 12와 13은 DGNB-mPBC가 각각 460,000CFU/㎖과 490CFU/㎖이고 시유 12의 DGN25-ATP과 DGN30-ATP의 ATP bioluminescence 값이 높아 2차오염이 일어난 것으로 예측되었으나 시유 12와 13의 SPC10d가 각각 10^6CFU/㎖이하이므로 내냉성 세균의 2차오염이 일어나지 않는 것으로 판정되었다. 시유 제품 7의 경우에는 DGN-mPBC, DGN25-ATP 및 DGN30-ATP가 낮은 세균수와 ATP bioluminescence 값을 나타내 2차오염이 없는 것으로 예측되었으나 SPC10d는 36,000,000CFU/㎖로 내냉성 그람음성 세균에 의한 2차오염이 일어났음을 알 수 있었다(Table 3).

DGN 배지를 이용한 2차오염 예측방법들이 SPC10d와 부분적으로 일치되지 않는 이유로서 DGN 배지가 그람양성세균을 충분히 억제하지 못하거나 시유 제품에 오염된 그람음성 세균이 중온성 세균이기 때문에 7℃에서 성장하지 못할 수도 있다. 또한 시유에 2차오염된 세균수가 매우 적어 예측방법들에 의해 검출이 안될 수도 있다.

유가공장 B의 3개의 저온 장시간 살균시유 제품들은 PI-mPBC가 10,000CFU/㎖ 이하였으며 시유 18을 제외하고 DGN-mPBC는 검출이 안되고, DGN25-ATP 및 DGN30-ATP는 500RLU 이하여서 그람음성세균의 2차오염이 없는 것으로 추정되었다. SPC10d도 5,000CFU/㎖ 이하이었다. 그러나 시유 18은 DGN-mPBC가 30을 나타내 그람음성세균의 오염이 있음을 예측되었으나 SPC10d가 220으로 나타나 DGN-mPBC의 세균수가 내냉성 그람음성세균이 아닐 수도 있었다(Table 3).

유가공장 C의 7개 고온 단시간 살균시유는 PI-mPBC가 비교적 높아 1,400CFU/㎖부터 39,000CFU/㎖으로서 비교적 고른 측정치를 보였으며 DGN-mPBC는 세균이 검출이 안되고 DGN25-ATP와 DGN30-ATP는 500RLU 미만이었다. SPC10d가 17,000CFU/㎖부터 720,000CFU/㎖으로서 상당히 높은 세균수에 도달하였으나 10^6CFU/㎖에는 도달하지 않았다. 따라서 유가공장 C의 제품은 2차오염이 일어나지 않았다고 생각할 수 있다.

유가공장 C의 시유 제품들이 PI-mPBC와 SPC10d가 높은 이유는 예비배양과 냉장저장중에 고온 단시간 살균공정 중에 생장세포로 전환된 *Bacillus*와 같은 포자형성 내냉성세균이 성장하기 때문인 것으로 생각되었다.

PI-mPBC 방법에서 2차오염의 기준점은 각 유가공장에 따라 달랐다. 유가공장 A의 경우 10CFU/㎖이상의 경우 전부 2차오염이었으며 유가공장 B의 경우에는 9,900CFU/㎖까지도 2차오염이 아니었다. 유가공장 C의 경우

에는 PI-mPBC가 다른 유가공장 보다도 높았는데 SPC10d가 낮아서 2차오염이 안된 것으로 판정되었다.

DGN25-ATP는 25℃의 배양온도가 낮아 세균이 충분히 성장하지 못하여 검출할 수 없었다. 그러나 DGN30-ATP는 DGN-mPBC에서 10CFU/㎖이상을 나타내는 10 제품 중에서 1 제품을 제외하고 500RLU 이상으로 측정되어 충분한 민감도를 나타내어 2차오염된 제품을 검출할 수 있었다. 따라서 ATP bioluminescence 방법을 이용하여 시유의 2차오염을 검출하기위하여 바람직한 배양온도는 30℃ 이상이어야 한다.

DGN-mPBC와 DGN30-ATP는 각각 측정에 소요되는 배양시간으로서 각각 43시간과 18시간이 소요되어 비교적 신속하게 측정할 수 있다. DGN30-ATP는 신속한 품질검사방법으로 응용할 수 있으나 시약의 안정성이 낮고 가격이 비싸기 때문에 실용화하기에는 어려운 점이 많다. 또한 Biofiltration system으로 다량의 시료를 여과할 때에 노동력 요구량이 크고 시유 시료에 따라 여과가 되지 않는 경우가 있고 또한 시료가 많은 경우 장시간 소요되는 단점이 있다.

다. 전기저항법을 이용한 그람음성세균 선택배지의 비교

그람음성 내냉성세균의 선택배지로서 DGN 배지 외에 CFC 배지와 Pseudosel 배지를 선택하였다. CFC 배지, DGN 배지, Pseudosel 배지는 각각 Pseudomonas, 그람음성세균, 비발효성 그람음성세균의 선택배지로 알려져 있다(Mead, 1985; Byrne 등, 1989; Atlas와 Parks, 1993). 탈지유에 세균을 접종한 후 동량의 CFC 배지, DGN 배지, Pseudosel 배지 또는 CP 배지를 첨가하고 21℃, 25℃, 30℃에서 18시간 배양한 후에 Bactometer에서 각각 21℃, 25℃ 및 30℃에서 48시간 배양하면서 DT를 측정하였다(Table 4).

CFC 배지가 첨가된 탈지유 배양액에서 그람양성세균은 성장하지 못하였으며 그람음성균 중에서 *K. pneumoniae*는 모든 온도에서 성장하지 못하였으며 *E. coli*는 21℃와 25℃에서 억제되었으나 30℃에서는 성장하였으며 *Flavobacterium* sp.는 21℃에서만 성장하였다. *Pseudomonas* 균주들과 *E. aerogenes*는 모든 온도에서 성장하였다(Table 4). *Pseudomonas*는 배양온도가 상승함에 따라 DT가 감소하였다. CFC는 *Pseudomonas*를 비롯한 일부 그람음성세균을 검출할 수 있는 배지인 것으로 확인이 되었으나 다른 그람음성세균의 성장을 억제하므로 우유에서 발견할 수 있는 그람음성세균의 오염을 검출하기에는 부적절하였다.

Table 4. Detection time of bacterial culture in the mixture of selective broth and skim milk. (unit : hour)

Bacteria \ Selective broth	CFC broth			DGN broth		
	21℃	25℃	30℃	21℃	25℃	30℃
B. coagulans	>48.0	>48.0	>48.0	>48.0	>48.0	>48.0
S. aureus	>48.0	nd[1]	>48.0	>48.0	nd	9.3
E. faecalis	>48.0	>48.0	>48.0	17.9	6.9	7.3
Lactococcus sp.	nd[1]	nd[1]	>48.0	nd[1]	nd[1]	3.1
E. coli	>48.0	>48.0	4.4	17.5	1.5	4.9
E. aerogenes	7.1	1.3	3.1	2.7	1.0	3.0
K. pneumoniae	>48.0	>48.0	>48.0	3.2	1.3	4.5
Flavobacterium sp.	7.1	>48.0	>48.0	>48.0	>48.0	47.6
P. fluorescens	7.1	7.8	4.4	7.1	4.9	4.2
P. fluorescens	12.3	7.7	2.6	12.3	9.1	2.5
P. putida	10.8	5.2	3.3	9.0	5.4	2.8

Bacteria \ Selective broth	Pseudosel broth			CP broth		
	21℃	25℃	30℃	21℃	25℃	30℃
B. coagulans	>48.0	>48.0	>48.0	41.7	17.2	28.2
S. aureus	>48.0	nd[1]	>48.0	>48.0	nd[1]	2.6
E. faecalis	>48.0	>48.0	>48.0	11.5	3.5	5.6
Lactococcus sp.	nd[1]	nd[1]	>48.0	nd[1]	nd[1]	5.0
E. coli	20.7	3.6	5.3	20.9	3.1	5.9
E. aerogenes	3.8	1.2	3.6	3.5	1.5	3.9
K. pneumoniae	3.9	1.5	3.9	3.7	1.4	3.8
Flavobacterium sp.	>48.0	>48.0	>48.0	>48.0	>48.0	>48.0
P. fluorescens	7.0	4.6	4.5	6.9	5.6	4.5
P. fluorescens	11.5	7.8	2.6	11.5	7.7	2.7
P. putida	10.4	5.9	3.2	7.1	6.0	3.7

nd Not determined

DGN 배지가 첨가된 탈지유 배양액에서 그람양성균 중에서 *B. coagulans*는 성장을 하지 못하였으며 *S. aureus*는 30℃에서만 성장하였으며 *E. faecalis*는 모든 온도에서 성장을 하였다. 그람음성균 중에서는 *Flavobacterium* sp.를 제외하고는 모든 세균이 성장을 하였으며 *E. coli*, *E. faecalis*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* 및 *Pseudomonas*의 DT값이 21℃에 비해 25℃에서 각각 감소하였다. 30℃에서 *Pseudomonas*의 DT 값은 더욱 감소하였다.

Pseudosel 배지가 첨가된 탈지유 배양액에서 모든 그람양성균은 억제되었으나 그람음성균은 *Flavobacterium* sp.을 제외한 모든 균이 성장하였다. *E. coli*는 DT값이 21℃에 비해 25℃에서 6배 감소하였으나 *E. aerogenes*와 *K. pneumoniae*는 2-3배, *Pseudomonas*는 1.5-2배 감소하였으며 30℃에서 DT가 증가하였다.

Cetrimide를 첨가하지 않은 Pseudosel(CP) 배지가 첨가된 탈지유 배양액에서 *Flavobacterium* sp. 외에 모든 세균이 성장하였다. CP 배지에서 그람음성균의 DT값은 DGN 배지와 Pseudosel 배지의 DT 값과 차이가 없어 DGN 배지 및 Pseudosel 배지의 sodium desoxycholate, crystal violet, cetrimide와 같은 그람양성세균 억제제에 의해 각 그람음성세균의 성장이 억제되지 않은 것으로 보였다.

DGN 배지를 첨가한 우유의 배양방법은 그람음성세균 뿐만 아니라 그람양성구균까지도 성장하므로 시유의 2차오염 검사방법으로 적절하지 않았다. 그러나 *E. faecalis*와 *S. aureus*을 DGN 한천배지에 streaking하였을 때에 성장하지 못하였다. 따라서 동량의 DGN 배지와 우유를 섞어 예비배양하면 DGN 배지에 있는 그람양성세균 억제제인 sodium desoxycholate와 crystal violet가 희석되어 충분한 억제력을 발휘하지 못하는 것으로 사료되었다.

마. 전기저항법을 이용한 시유의 검사

유가공장 A의 저온장시간 살균 시유와 유가공장 B F의 초고온순간 살균 시유들을 구입하여 전기저항법을 사용하여 2차오염을 측정하였다. 시유에 sodium desoxycholate와 cetrimide가 첨가된 Trypticase soy broth(SG-TSB)를 동량 혼합하여 21℃와 25℃에서 18시간 배양한 후에 Bactometer에서 각각 21℃와 25℃에서 48시간 배양하면서 DT를 측정하였다. 유가공장 A의 저온장시간 살균시유들 중에서 시유 제품 2가 25℃에서 DT가 24시간이었으며 시유 제품 5가 21℃에서 21시간이고 25℃에서 9시간이어서 이 시유 제품들이 2차오염이 되었음을 예측하였다. 시료 2와 5는

7℃에서 10일간 냉장 저장한 후의 세균수(SPC10d)도 각각 470,000CFU/㎖와 350,000,000CFU/㎖이어 2차오염이 일어났음을 확인할 수 있었다. 초고온순간 살균 시유 10, 12 및 14는 전기저항법에서 DT가 48시간 내에 검출이 안되었으나 SPC10d가 10^6CFU/㎖ 이상으로서 2차오염이 되었음을 알 수 있었다.

Table 5. Detection of post-pasteurization contamination of market milk by using impedance method

Sample No.	Plant	Detection time (hour)		SPC10d (CFU/㎖)
		21℃	25℃	
1	A	> 48	> 48	4,900
2	A	> 48	24	470,000
3	A	> 48	> 48	4,200
4	A	> 48	> 48	3,800
5	A	21	9	350,000,000
6	B	> 48	> 48	8,100
7	B	> 48	> 48	< 100
8	B	> 48	> 48	< 100
9	B	> 48	> 48	< 100
10	C	> 48	> 48	9,800,000
11	C	> 48	> 48	< 100
12	C	> 48	> 48	3,100,000
13	C	> 48	> 48	12,000
14	D	> 48	> 48	1,200,000
15	E	> 48	> 48	110.000
16	E	> 48	> 48	< 100
17	F	> 48	> 48	< 100

유가공장 A의 저온장시간 살균시유는 2차오염으로 인해 유입된 그람음성세균이 초고온순간 살균시유에 비하여 많아 전기저항법에 의하여 검출이 되었던 것으로 생각되었다. 초고온순간 살균시유의 2차오염을 검출하기 위하여 전기저항법의 민감도를 증가시킬 필요가 있으며 이를 위해서 Bactometer module에 첨가하는 배양액 시료량을 증가할 필요가 있으며 배양온도와 시간을 조절할 필요가 있다고 생각된다.

4. 적 요

ATP bioluminescence와 전기저항법을 이용하여 시유의 2차오염을 예측할 수 있는 방법을 조사하였다. DGN 배지, BG-TGY 배지 및 CV-TGY 배지

에 접종한 탈지유를 첨가하고 배양한 후에 ATP bioluminescnece 방법으로 측정한 결과 BG-TGY 배지는 *Pseudomonac fluorescens*의 성장을 억제하였으며 DGN 배지와 CV-TGY는 그람양성세균만을 억제하였다. 유가공장 A에서 생산한 대부분의 저온장시간 살균 시유는 7℃에서 10일간 저장한 후의 세균수가 10^6CFU/㎖ 이상이어서 2차오염되었음을 알 수 있었다. 배양온도가 30℃일 때가 25℃일 때보다도 ATP bioluminescece 값이 높았으며 DGN 배지에서 배양하여 측정한 ATP bioluminescece 값이 SPC10d와 일정한 관계를 갖지 못하였다. 전기저항법을 사용하면 CFC 배지에서 *Pseudomonas*와 *E. aerogenes* 만이 성장하였으며 DGN 배지에서 그람음성세균뿐만 아니라 *E. faecalis*와 *S. aureus*가 성장하였으며 Pseudosel 배지에서는 그람양성세균은 억제되고 그람음성세균이 성장하였다. 시유에 SC-TSB 배지를 첨가하여 배양한 후에 전기저항법으로 측정하므로서 저온장시간 살균시유의 2차오염을 검출할 수 있었으나 초고온순간 살균 시유는 검출할 수 없었다.

제 4 절 색소환원법에 의한 시유의 2차오염 검출을 위한 그람음성세균 선택성 배지

SUMMARY

Dye reduction method and gram-negative bacteria selective broth were developed to detect post-pasteurization contamination in milk processing. Methylene blue reduction method did not detect growth of *Pseudomonas* but resazurin reduction method detected its growth. The growth of gram-positive and gram-negative bacteria in cephaloridine-fucidine-cetrimide(CFC) broth, dairy gram negative(DGN) broth, and Pseudosel broth which were added to equal volume of skim milk was determined by using resazurin reduction method. CFC broth inhibited growth of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and all gram-positive bacteria. *Enterococcus faecalis*, and *Lactococcus* sp. as well as most of gram-negative bacteria grew in the mixture of skim milk and DGN broth. Only gram-negative bacteria grew in the mixture of skim milk and Pseudosel broth. The growth of gram-positive cocci and spore-forming gram-positve bacilli in market milk which was mixed with DGN broth and Pseudosel broth, respectively, was detected. Addition of sodium desoxycholate to Pseudosel broth inhibited spore-forming gram-positive bacilli and enabled selective detection of gram-negative bacteria in market milk. The gram negative bacteria isolated from market milk were identified as *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter sakazakii*, *Pseudomonas* spp. and *Aeromonas salmonicida*.

(Key word : Market milk, Post-pasteurization contamination, gram negative bacteria, resazurin)

1. 서 론

위생적으로 안전하고 저장성이 우수한 시유를 생산하기 위하여 세균수가 적은 우유를 원료로 사용하여야하며 규정된 살균 온도와 시간에서 열처리하고 살균 후 오염이 일어나지 않도록 생산하여야 한다. 식품공전에

서는 살균 후 오염은 2차오염으로 명명하고 있다(한국식품공업협회, 1994). 우유의 살균을 위한 열처리 공정에서 내열성이거나 포자형성하는 그람양성세균은 살아남으나 그람음성세균은 모두 사멸된다. 따라서 시유에 오염된 그람음성세균의 존재 여부를 검출하므로서 우유의 2차오염 여부를 검출할 수 있다. 살균된 우유는 저장과 유통 중에 냉장 온도에서 저장하므로 내냉성 그람음성세균은 우유의 저장성에 중요하다.

2차오염된 그람음성세균의 검출 방법은 신속하고 신뢰성이 있어야 시유의 제조 공정을 적시에 개선할 수 있으며 오염의 심각 정도에 따라 조기 판매 또는 판매 정지 등의 결정을 내릴 수 있다(Bishop과 White, 1986; IDF, 1993). 그러나 일반적으로 2차오염에 의해 시유에 유입된 그람음성세균수가 적어 한천배지 배양방법으로 즉시 검출하기가 어렵다. 따라서 시유에 오염된 그람음성 내냉성 세균을 선택적으로 배양한 후에 세균수를 검사하는 방법이 사용되었다. 내냉성 세균의 생장을 촉진하는 18 21℃의 온도에서 시유를 배양한 후에 (White 등, 1993) 또는 그람음성세균의 선택적 생장에 적합한 배지를 시유와 혼합하여 배양한 후에 한천배지에서 세균수를 측정하는 방법(Byrne 등, 1989b; Phillips 등, 1984)과 Bactemeter를 이용한 전기저항법 (Bishop 등, 1984; Bossuyt와 Vaes, 1983, Visser와 de Groote, 1984) 또는 ATP-bioluminescence 방법(Vaes와 Bossuyt, 1982)이 시유의 저장성과 2차오염을 측정하는 방법으로 연구되었다.

Langeveld 등 (1976)은 살균포장된 우유를 24시간 동안 25℃에서 배양한 후 benzalkonium chloride가 함유된 평판에 streak하여 30℃에서 24시간 배양하여 그람음성세균을 검출하였다. Byrne 등 (1989a)은 우유를 예비배양할 때에 benzalkonium chloride를 첨가한 nutrient broth 또는 dairy gram negative(DGN) 배지를 우유와 1:1로 섞어 21℃에서 18시간 배양한 후에 내냉성세균수를 조사하거나 또는 전기저항법으로 조사한 결과가 우유의 저장성과 높은 상관관계를 보였다고 보고하였다. 또한 배양할 때에 그람음성 선택배지와 섞지않고 저장성을 측정한 결과도 높은 상관관계를 보였다.

본 연구는 시유의 그람음성세균의 오염을 색소환원법을 이용하여 검출할 수 있는 선택배지와 배양온도를 조사하는 것이 목적이다.

2. 재료 및 방법

가. 세균 균주

본 실험에 사용한 균주 중 *Lactococcus* sp.는 Chr. Hansen의 치즈 스

타터(R-703)으로부터 분리하였으며 다른 세균은 한국생명공학연구소 유전자은행으로부터 구입하였다 (Table 1). *Pseudomonas* 균주들은 26℃에서 배양하였으며 다른 세균들은 30℃에서 24시간 동안 2회 계대배양한 후 실험에 사용하였다. 계대배양에 사용한 배지는 tryptone-yeast extract-glucose(TGY) broth 이었다.

Table 1. The bacterial strains and their optimum incubation temperature used in the study

Bacteria	Sources
Bacillus circulans	KCTC 3347
Staphylococcus aureus	KCTC 1928
Enterococcus faecalis	KCTC 3512
Lactococcus sp.	Chr. Hansen R-703
Escherichia coli	KCTC 2441
Klebsiella pneumoniae	KCTC 2001
Enterobacter aerogenes	KCTC 2190
Flavobacterium sp.	KCTC 2480
Pseudomonas fluorescens	KCTC 2344
Pseudomonas fluorescens	KCTC 1767
Pseudomonas putida	KCTC 1644

나. 예비 배양

TGY broth에서 배양된 세균을 멸균된 PBS 용액에 McFarland nephlometer를 사용하여 희석하여 10^3 CFU/㎖가 되게 탈지유(5㎖)에 접종하였으며 동량의 dairy gram negative (DGN) 배지(Byrne 등, 1989a), cephaloridine-fucidine-cetrimide (CFC) 배지(Atlas와 Parks, 1993; Mead, 1985), Pseudosel 배지(Atlas와 Parks, 1993), cetrimide를 뺀 Pseudosel 배지와 각각 혼합하여 18℃, 21℃, 25℃ 및 30℃에서 각각 18시간 배양한 후 색소환원법에 사용하였다.

DGN배지는 tryptone(20.0g/ℓ), yeast extract(20.0g/ℓ), dextrose(4.0g/ℓ), sodium desoxycholate (0.5g/ℓ), 및 crystal

violet(0.0001㎎/ ℓ)를 증류수에 용해한후 121℃에서 autoclave하였다. CFC 배지는 peptone(16.0g/ ℓ), tryptone(10.0g/ ℓ), K_2SO_4(10.0g/ ℓ), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$(1.4g/ ℓ) 및 glycerol(10.0㎖/ ℓ)를 증류수에 용해하여 121℃에서 autoclave한 후에 막여과하여 멸균한 CFC 선택성 시약 용액(cephaloridine(5㎎/㎖), fucidine(1㎎/㎖), cetrimide(1㎎/㎖)) 10㎖를 첨가하여 제조하였다. Pseudosel 배지는 peptone(20.0g/ ℓ), K_2SO_4(10.0g/ ℓ), $MgCl_2$(1.4g/ ℓ), cetrimide(0.15g/ ℓ) 및 glycerol(10.0㎖/ ℓ)을 용해하여 118℃에서 autoclave하였다.

다. 색소환원법

0.22㎛ membrane(Gelman)으로 여과하여 멸균한 methylene blue 용액(44㎍/㎖) 또는 resazurin 용액(55㎍/㎖) 1㎖를 배양액 10㎖에 첨가하여 30℃에서 배양하면서 청색이 백색, 홍색 또는 보라색으로 각각 환원되는 시간을 매 1시간 간격으로 10 시간 동안 관찰하면서 측정하였다. 우유의 변색이 관찰될 때의 보라색, 홍색, 백색을 각각 P, R, W로 기록하였다.

라. 세균의 동정

그람음성 세균의 동정은 API 20E(bioMerieux sa)를 사용하였으며 추가로 운동성 검사는 motility test media를 사용하여 결정하였으며 oxidation-fermentation 검사는 Hugh and Leifeon's OF basal medium을 사용하였다(MacFaddin, 1980).

마. 세균의 염색

그람 염색은 Modified Hucker crystal violet 방법(Hendrickson과 Krenz, 1991)를 사용하였으며 포자의 염색은 Schaffer와 Fulton(1933)의 방법을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

우유의 저장성은 2차오염에 관련된 *Pseudomonas*을 비롯한 그람음성 내냉성세균에 의해 영향을 받는다. 그러나 2차오염 초기에는 세균들의 오염도가 낮기 때문에 검출하기 어렵다. 따라서 그람음성 내냉성 세균의 성장을 촉진하는 조건에서 우유시료를 예비배양을 한 후 2차오염 여부를 측정하고 저장성을 예측할 수 있다.

Table 2. Methylene blue reduction time(hour) of skim milk inoculated with bacteria and incubated after addition of selective broth

broth / bacteria	CFC broth		DGN broth		Pseudosel broth		Pseudosel broth without cetrimide	
	21℃	25℃	21℃	25℃	21℃	25℃	21℃	25℃
B. circulans	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
S. aureus	>10	nd	>10	nd	>10	nd	>10	nd
E. faecalis	>10	>10	7	1	>10	>10	2	0.5
E. coli	>10	>10	8	1	8	>10	8	3.1
E. aerogenes	>10	1	3	1	3	1	3	1.5
K. pneumoniae	>10	>10	3	1	3	3	3	1.4
Flavobacterium sp.	>10	>10	>10	7	>10	>10	>10	>10
P. fluorescens	>10	8	>10	8	>10	8	>10	5.6
P. fluorescens.	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	7.7
P. putida	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	6.0

그람음성 내냉성세균의 선택성 배지로서 DGN배지, CFC 배지 및 Pseudosel 배지를 선택하였다. CFC 배지, DGN 배지, Pseudosel 배지는 각각 *Pseudomonas*, 그람음성세균, 비발효성 그람음성세균에 대해 선택성이 있는 배지로 알려져 있다(Mead, 1985; Byrne 등, 1989a; Atlas와 Parks, 1993). 이 배지들을 시유와 동량 혼합하여 18 30℃에서 18시간 배양하여 그람음성세균이 선택적으로 성장하게 한 후에 methylene blue 또는 resazurin을 첨가하여 30℃에서 배양하여 색소의 환원 여부와 시간에 따라 시유의 2차오염을 검출할 수 있고 저장성을 예측할 수 있을 것이다. 우유에 오염된 내냉성 그람음성세균을 검출할 수 있는 선택배지, 배양온도, 및 산화환원색소를 연구하였다.

세균(10^3/㎖)을 접종한 탈지유에 동량의 배지를 혼합하여 21℃와 25℃에서 18시간 예비 배양한 후에 methylene blue를 첨가하고 다시 30℃에서 배양하면서 청색이 백색으로 변하는 시간을 측정하였다 (Table 2). 동량의 CFC 배지를 혼합한 탈지유에서 *E. aerogenes* 만이 methylene blue를 환원시켰으며 DGN 배지의 경우 *E. faecalis*, *E. coli*, *E. aerogenes* 및 *K. pneumoniae*가 Pseudosel 배지에서는 *E. aerogenes*와 *K. pneumoniae*가 methylene blue를 환원하였다. 그러나 *P. fluorescens*와 *P. putida*는 대부분 음성이었으며 양성이라 하더라도 환원시간이 길었다. 이 결과로부터 methylene blue 환원시험을 이용하여 *Pseudomonas*를 검출할 수 없음을 알

수 있었으며 시유의 2차오염 검출 방법 및 저장성 검사로서 부적절함을 알 수 있었다.

Table 3. Resazurin reduction time(hour) of skim milk inoculated with bacteria and incubated after addition of selective broth at 18℃ and 2 1 ℃

broth / bacteria	CFC broth		DGN broth		Pseudosel broth		Pseudosel broth without cetrimide	
	18℃	21℃	18℃	21℃	18℃	21℃	18℃	21℃
B. circulans	>10	>10	6.5	6.5	>10	>10	>10	>10
S. aureus	>10	>10	6.5	6.5	>10	>10	7.5	5.5
E. faecalis	>10	>10	3.5	1.5	>10	>10	1.5	0.5
Lactococcus spp.	>10	>10	3.5	1.5	>10	>10	1.5	0.5
E. coli	>10	5.5	3.5	1.5	4.5	1.5	1.5	0.5
E. aerogenes	5.5	1.5	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5
K. pneumoniae	1.5	1.5	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5
Flavobacterium sp.	nd	nd	4.5	6.5	nd	nd	nd	nd
P. fluorescens	2.5	1.5	2.5	1.5	2.5	1.5	2.5	1.5
P. fluorescens.	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
P. putida	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

nd: Not determined

산화환원색소로서 methylene blue 대신에 resazurin을 사용하였다. 18℃와 21℃에서 18시간 배양한 후에 resazurin을 첨가하여 30℃에서 배양하면서 청색이 보라색, 홍색, 또는 백색으로 변화하는 시간을 측정하였다 (Table 3). 모든 배지의 경우에서 *Pseudomonas*는 1.5 2.5시간이내에 보라색으로 환원하였다. *Pseudomonas* 외에 CFC 배지에서 *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* 및 *E. coli*가 resazurin을 환원하였으며 DGN 배지는 모든 세균이 환원하였다. Pseudosel 배지에서 그람양성세균은 음성이며 그람음성세균은 양성이었다. Cetrimide를 첨가하지 않은 Pseudosel 배지는 *B. circulans*를 제외한 모든 세균이 양성이었다.

25℃와 30℃에서 18시간 배양한 후 resazurin을 첨가하여 배양한 경우에는 *P. fluorescens*가 0.5 1.5시간에 보라색으로 환원되었다(Table 4).

반면에 CFC 배지에서는 *E. aerogenes*가 양성이었으며 DGN 배지는 그람음성세균 뿐만 아니라 *Lactococcus* sp., *E. faecalis* 및 *S. aureus*도 양성이었다. Pseudosel 배지에서 그람양성세균은 음성이며 그람음성세균은 양성이었다. Cetrimide를 첨가하지 않은 Pseudosel 배지에서는 *B. circulans*를 제외한 모든 세균이 양성이었다. *Pseudomonas*는 환원되어 변색이 확인될 때에 보라색이었으며 계속해서 배양해도 홍색과 백색으로 변색되지 않았다. 반면에 다른 그람음성세균은 보라색, 홍색, 백색으로 계속해서 변색하였다.

Table 4. Resazurin reduction time(hour) of skimmilk inoculated with bacteria and incubated after addition of selective broth at 25℃ and 30℃.

배지 / 균주	CFC broth		DGN broth		Pseudosel broth		Pseudosel broth without cetrimide	
	25℃	30℃	25℃	30℃	25℃	30℃	25℃	30℃
B. circulans	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
S. aureus	>10	>10	>10	5.5	>10	>10	1.5	0.5
E. faecalis	>10	>10	>10	0.5	>10	>10	0.5	0.5
Lactococcus sp.	>10	>10	0.5	0.5	>10	>10	0.5	0.5
E. coli	>10	>10	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
E. aerogenes	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
K. pneumoniae	>10	>10	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
P. fluorescens	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5
P. fluorescens.	0.5	0.5	0.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5
P. putida	0.5	0.5	0.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5

이상의 실험 결과 resazurin 방법은 모든 그람음성세균에 의한 환원시간이 비교적 짧아 신속하게 시유의 저장성을 예측할 수 있는 방법이었다. 3 종류의 선택배지들 중에서 Pseudosel 배지가 그람음성세균에 대해 선택성이 가장 높았다. 반면에 DGN 배지에서는 그람양성세균이 성장하였으며 CFC 배지에서는 일부 그람음성세균이 온도에 따라 성장하지 않았다(Table 3과 4).

Pseudosel 배지와 DGN 배지에 동량의 시유를 혼합하여 25℃에서 18시간 배양한 후 resazurin을 첨가하여 30℃에서 배양하면서 환원 시간을 측정하였다. 환원된 배양액은 plate count agar에 접종하여 형성된 집락을 그람염색과 포자염색하여 조사였다 (Table 5). DGN 배지와 혼합하여서 배양하였을 때에 유가공장 A, B, 및 D에서 생산한 시유들에 첨가한 resazurin이 환원되었으며 그람음성 간균과 그람양성 구균이 검출하였다. Pseudosel 배지와 혼합하여 배양하였을 때에 유가공장 A, B, C, D에서 생산한 시유들에 첨가된 resazurin이 환원되었으며 그람음성 간균과 그람양성 간균이 검출되었다. 그람양성 간균은 포자염색에 의해 포자가 형성되었음을 발견되어 *Bacillus* 임을 알 수 있었다. 따라서 Pseudosel과 혼합하여 배양하였을 때에는 우유내에 존재하는 *Bacillus*가 억제되지 않고 성장하여 resazurin을 환원함을 알 수 있었다.

Table 5. Resazurin reduction time of market milk

Sample No.	Plant	DGN broth		Pseudosel broth	
		Time (hour)	Gram staining	Time (hour)	Gram staining
1	A	0.5	- rods	>10	
2	A	0.5	- rods	3.5	- rods
3	A	0.5	- rods	2.5	- rods
4	A	>10		0.5	+ rods
5	B	6.5	nd	2.5	+ rods
6	B	3.5	+ cocci	>10	
7	B	5.5	nd	5.5	+ rods
8	B	7.5	nd	0.5	+ rods
9	B	5.5	+ cocci	2.5	+ rods
10	C	>10		0.5	+ rods
11	C	>10		0.5	nd
12	C	>10		>10	
13	C	>10		>10	
14	D	9.5	nd	>10	
15	D	8.5	- rods	4.5	- rods
16	D	5.5	- rods	5.5	- rods
17	E	>10		>10	
18	E	>10		>10	

Table 6. Identification of gram negative bacteria isolated from market milk

Strains	A25-1	A25-2	A7
β-Galactosidase	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	+
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-
H_2S production	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophane desaminase	-	-	-
Indole production	-	-	-
Acetoin production	+	+	+
Gelatinase	-	-	-
Fermentation /oxidation of			
Glucose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	+	+	+
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Melibiose	+	+	+
Amygdalin	+	+	+
Arabinose	+	+	+
Cytochrome oxidase	-	-	-
Identification	*Enterobacter agglomerans* 4	*Enterobacter agglomerans* 4	*Enterobacter sakazakii*

Pseudosel 배지와 혼합하여 25℃에서 18시간 배양된 시유(Table 5)와 7℃에서 10일간 저장된 시유에서 분리한 그람음성 세균을 분리하여 API 20E kit를 사용하여 동정하였다(Table 6과 7). 유가공장 A의 시유를 25℃에서 배양하여(Table 5) 분리한 그람음성세균 A25-1과 A25-2는 *Enterobacter agglomerans*으로 동정되었으며 동일한 시유를 7℃에서 10일간 냉장 저장한 시유에서 분리한 그람음성 세균 A7은 *Enterobacter sakazakii* 이었다(Table 6). 한편 유가공장 D에서 생산한 시유를 25℃에서 배양하여 분리한 그람음성 세균 D25은 *Pseudomonas* sp. 이었으며 동일한 시유를 7℃에서 10일간 냉장 저장한 시유에서 분리한 그람음성세균 D7-1

과 D7-2는 *Aeromonas salmonicida*이었으며 D7-3은 동정할 수 없는 형태의 생화학적 반응을 보였다 (Table 7).

Table 7. Identification of gram negative bacteria isolated from market milk

Strains	D25	D7-1	D7-2	D7-3
β-Galactosidase	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	-
H_2S production	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Tryptophane desaminase	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	+
Acetoin production	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+
Fermentation/oxidation of				
Glucose	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-
Cytochrome oxidase	-	+	+	+
Nitrate production	-	-	-	-
Reduction to N_2 gas	+	-	-	+
Motility	+	+	+	+
McConkey medium	+	-	-	-
Fermentation of glucose	-	+	+	-
Oxidation of glucose	-	+	+	-
Identification	*Pseudomonas* sp.	*Aeromonas salmonicida*	*Aeromonas salmonicida*	Not identifed

시유에 2차오염되어 검출된 그람음성 세균의 종류는 유가공장에 따라 다를 뿐만 아니라 25℃에서 배양되어 resazurin을 환원시키는 세균과 7℃에서 냉장 저장할 때에 성장하는 세균이 달랐다. 그러나 이 연구에서 분리된 모든 그람음성세균들은 내냉성 세균의 일종으로서 시유의 저장성을 감소시키는 세균이다

DGN 배지는 그람양성 구균의 생장이 가능하고 Pseudosel 배지에서는 *Bacillus*가 생장하여 이들 선택배지에 첨가되어 있는 그람음성 세균 선택성 시약인 cetrimide, crystal violet 및 sodium desoxychoate을 선택하여 혼합하여 첨가하면 그람양성 구균과 *Bacillus* 모두 성장이 억제되는 그람음성세균 선택배지가 될 수 있다. 이러한 배지를 제조하기 위하여 crystal violet 또는 sodium desoxycholate를 첨가한 Pseudosel 배지와 시유를 혼합하여 예비배양한 후에 resazurin 검사를 하였다 (Table 8).

Table 8. Resazurin reduction time of market milk incubated at 25℃ after addition of Pseudosel broth added with crystal violet and sodium desoxycholate

Plant	No addition		crystal violet		Desoxycholate		Desoxycholate and crystal violet		SPC
	Time (hr)	Gram stain	Time (hr)	Gram stain	Time (hr)	Gram stain	Time (hr)	Gram stain	CFU/㎖
A	0.5	+ rod	1.5	+ rod	>10		>10		5,000
A	0.5	+ rod	0.5	+ rod	>10		>10		1,500
A	1.5	+ rod	2.5	+ rod	>10		>10		9.700
A	1.5	+ rod	>10		>10		>10		6,600
B	>10		>10		>10		>10		>25
B	>10		>10		>10		>10		>25
B	>10		>10		>10		>10		>25
B	>10		6.5	+ rod	2.5	- rod	>10		2,900,000

Pseudosel 배지와 crystal violet이 첨가된 Pseudosel 배지에서는 *Bacillus*가 검출되었다. 유가공장 B의 250㎖ 시유 제품의 경우에서 sodium desoxycholate가 첨가된 Pseudosel 배지과 혼합하여 배양 하였을 때에 그람음성 세균만이 검출되었다(Table 8). 또한 이 시유 제품만이 10일간 7℃에서 냉장 저장하였을 때에 10^6CFU/㎖이상의 세균수를 보였다. 이 실험 결과에서 그람음성 세균에 의한 시유의 2차오염이 시유의 저장성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. Cetrimide와 sodium desoxycholate

를 첨가한 배지를 이용하여 *Pseudomonas*를 비롯한 그람음성 세균들을 선택적으로 배양할 수 있는 배지를 만들 수 있을 것이다. 앞으로 이 성분들의 배지 내의 농도를 결정하고 다른 영양성분이 그람음성 세균의 성장에 미치는 효과에 대하여 연구할 예정이다.

4. 적 요

시유의 2차오염 검출과 저장성의 예측방법으로서 색소환원방법과 그람음성세균의 선택배지를 개발하였다. Methylene blue 환원방법은 *Pseudomonas*를 검출하지 못하여 그람음성세균 검출 방법으로서 적절하지 못하였으며 반면에 resazurin 환원방법은 검출할 수 있었다. 그람음성세균 선택배지로서 cephaloridine-fucidine-cetrimide(CFC) 배지, dairy gram-negative(DGN) 배지, 및 Pseudosel 배지를 비교하였다. CFC 배지는 그람양성세균 뿐만아니라 *Escherchia coli* 및 *Klebsiella pneumoniae*의 성장을 억제하였다, DGN 배지는 그람음성세균과 *Entercoccus faecalis*와 *Lactococcus* sp.와 같은 그람양성구균이 성장하였다. Pseudosel 배지에서는 그람음성세균만이 성장하였다. DGN 배지와 Pseudosel 배지를 혼합하여 시유를 배양하여 resazurin 환원법으로 검사한 결과 환원이 검출된 시유 배양액에서 각각 그람양성구균과 포자를 형성하는 그람양성간균이 검출되었다. Pseudosel 배지에 desoxycholate를 첨가한 배지에 시유를 혼합하여 배양하면 포자형성 그람양성간균의 생장이 억제되어 그람음성세균이 오염된 제품을 특이적으로 검출할 수 있었다. 2차오염된 시유로부터 검출된 그람음성세균은 *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter sakazakii*, *Pseudomonas* sp. *Aeromonas salmonicida*으로 동정되었다.

제 5 절 시유의 2차오염 결정하기 위한 Resazurin 환원시간 검사와 그람음성세균의 동정

SUMMARY

Resazurin reduction time test consisting of preliminary incubation of market milk with SC-TS broth was studied to apply to detection of post-pasteurization of market milk produced in different months. Gram-positive bacteria did not grow SC-TS agar but gram-negative bacteria did. All of the bacteria isolated from resazurin reduction time test were gram negative bacteria, which showed that SC-TS medium was reliable for using in resazurin reduction time test to detect post-pasteurization contamination of market milk. Resazurin reduction time test and bacteria number of market milk after cold storage in May, June and September after were highly related each other but not in July and Autumn. *Pseudomonas* was the most frequently identifed gram-negative bacteria of all isolated from the market milk after cold storage. *Acinetobacter* and *Aeromonas* followed. *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Enterobacter* were frequently identified in resazurin reduction time test where preliminary incubation of mixture of skim milk and SC-TS medium was done at 21℃.

(Key words; Market milk, Gram negative bacteria, Post-pasteurization contamination, Resazurin reduction time)

1. 서 론

우유의 살균 후 오염(2차오염)된 그람음성세균의 검출 방법은 신속하고 신뢰성이 있어야 시유의 제조 공정을 적시에 개선할 수 있으며 오염의 심각 정도에 따라 조기 판매 또는 판매 정지 등의 결정을 내릴 수 있다 (Bishop과 White, 1986; IDF, 1993). 그러나 일반적으로 2차오염에 의해 시유에 유입된 그람음성세균수가 적어 한천배지 배양방법으로 즉시 검출하기가 어렵다. 따라서 시유에 오염된 그람음성 내냉성 세균을 선택적으

로 배양한 후에 세균수 또는 세균의 대사산물을 검사하는 방법이 사용되었다. 내냉성 세균의 생장을 촉진하는 18 21°C의 온도에서 시유를 배양한 후에 (White 등, 1993) 또는 그람음성 세균의 선택적 생장에 적합한 배지를 시유와 혼합하여 배양한 후에 한천배지에서 세균수를 측정하는 방법(Byrne 등, 1989b; Phillips 등, 1984)과 Bactometer를 이용한 전기저항법 (Bishop 등, 1984; Bossuyt와 Waes, 1983, Visser와 de Groote, 1984) 또는 ATP-bioluminescence 방법(Waes와 Bossuyt, 1982)이 시유의 저장성과 2차오염을 측정하는 방법으로 연구되었다.

Langeveld 등 (1976)은 살균포장된 우유를 24시간 동안 25°C에서 배양한 후 benzalkonium chloride가 함유된 평판에 streak하여 30°C에서 24시간 배양하여 그람음성세균을 검출하였다. Byrne 등 (1989a)은 우유를 예비배양할 때에 benzalkonium chloride를 첨가한 nutrient broth 또는 dairy gram negative(DGN) 배지를 우유와 1:1로 섞어 21°C에서 18시간 배양한 후에 내냉성세균수를 조사하거나 또는 전기저항법으로 조사한 결과가 우유의 저장성과 높은 상관관계를 보였다고 보고하였다.

본 연구는 시유의 그람음성세균의 오염을 색소환원법을 이용하여 검출할 수 있는 선택배지로서 sodium desoxycholate와 cetrimide를 첨가한 trypticase soy broth(SG-TS 배지)를 사용하므로서 그람음성세균을 선택적으로 배양할 수 있는 장점을 앞 절에서 보고하였다. 이 절에서는 SG-TS 배지의 그람음성세균에 대한 선택성을 비교조사하고 국산 시유에 응용한 결과를 보고한다.

Table 1. The bacterial strains and their optimum incubation temperature used in the study

Bacteria	Sources
Bacillus coagulans	KCTC 1015
Bacillus circulans	KCTC 3347
Staphylococcus aureus	KCTC 1928
Enterococcus faecalis	KCTC 3512
Escherichia coli	KCTC 2441
Klebsiella pneumoniae	KCTC 2001
Enterobacter aerogenes	KCTC 2190
Flavobacterium sp.	KCTC 2480
Pseudomonas fluorescens	KCTC 2344
Pseudomonas fluorescens	KCTC 1767
Pseudomonas putida	KCTC 1644
Achromobacter lyticus	KCTC 2336
Acinetobacter baumii	KCTC 2508
Alcaligens faecalis	KCTC 2678

2. 재료 및 방법

가. 세균 균주

본 실험에 사용한 균주는 한국생명공학연구소 유전자은행으로부터 구입하였다 (Table 1). *Pseudomonas* 균주들은 26 ℃에서 배양하였으며 다른 세균들은 30 ℃에서 24시간 동안 2회 계대 배양한 후 실험에 사용하였다. 계대 배양에 사용한 배지는 tryptone-yeast extract-glucose broth 이었다.

나 배지의 제조

SG-TS agar는 Trypticase soy agar(Difco)에 sodium desoxycholate (0.25g/ ℓ)와 cetrimide(0.075g/ ℓ)을 첨가하였으며 NPC agar는 plate count agar(Difco)에 10㎖의 그람음성 세균 선택성 용액(nisin (10mg/ml), penicillin G (20,000 unit/ml), crystal violet (2mg/ml))을 첨가하였으며 desoxycholate-hydrogen sulfide-lactose(DHL) agar(Daigo, Japan)와 MacConkey agar(Difco)를 사용하였다.

Resazurin 검사에서 시유의 예비배양을 위한 SG-TS 배지는 Trypticase soy broth에 sodium desoxycholate (0.5g/ ℓ)와 cetrimide (0.15g/ ℓ)을 증류수에 용해한 후 118 ℃에서 15분간 멸균하였다. MacConkey 배지는 peptone (17g/ ℓ), Proteose peptone (3g/ ℓ), lactose (10g/ ℓ), bile salts No. 3(Difco) (1.5g/ ℓ), sodium chloride (5g/ ℓ), crystal violet (0.001g/ ℓ)을 증류수에 용해한 후 121 ℃에서 15분간 멸균하였다. DGN배지는 tryptone(20.0g/ ℓ), yeast extract(20.0g/ ℓ), dextrose(4.0g/ ℓ), sodium desoxycholate (1.0g/ ℓ), 및 crystal violet(0.0002㎎/ ℓ)를 증류수에 용해한후 121 ℃에서 autoclave하였다. CFC 배지는 peptone(16.0g/ ℓ), tryptone(10.0g/ ℓ), K_2SO_4(10.0g/ ℓ), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$(1.4g/ ℓ) 및 glycerol(10.0㎖/ ℓ)를 증류수에 용해하여 121 ℃에서 autoclave한 후에 막여과하여 멸균한 CFC 선택성 시약 용액 (cephaloridine(5㎎/㎖), fucidine(1㎎/㎖), cetrimide(1㎎/㎖)) 20㎖를 첨가하여 제조하였다.

다. Resazurin 검사

제조일 또는 제조 후 1일이 되는 시유를 구입하여 resazurin 검사에 사용하였다. 시유 50㎖를 무균적으로 동량의 배지가 들어 있는 media 병에서 부어 혼합한 다음 21 ℃, 25 ℃ 및 30 ℃에서 18시간 배양하였다. 배양액 10㎖를 채취하여 시험관에 옮기고 1㎖의 resazurin(55㎍/㎖) 용액을 첨가하고 30 ℃에서 배양하고 30분 후 부터 청색이 보라색, 적색 및 흰색

으로 변하는 시간을 매시간 조사하였다.

라. 시유의 저장성 검사

멸균된 250㎖ 용량의 media병에 200㎖의 시유를 옮겨넣어 7℃에서 10일간 저장한 후에 표준평판법으로 계수하였다.

마. 세균의 동정

그람음성 세균의 동정은 API 20E와 API 20NE(bioMerieux sa)를 사용하였으며 추가로 운동성 검사는 motility test media를 사용하여 결정하였으며 oxidation-fermentation 검사는 Hugh and Leifeon's OF basal medium을 사용하였다(MacFaddin, 1980). 순수 분리한 그람 음성 세균은, cytochrome oxidase가 음성이고 glucose fermentation/oxidation가 양성인 API 20E로 동정하였으며 그 외의 균주는 API 20NE로 동정하였다.

3. 결과 및 고찰

그람음성세균에 대해 선택성이 있는 배지들에 대한 표준 세균들의 성장 여부를 조사하였다. NPC agar, DHL agar, MacConkey agar 및 SC-TS agar에 streaking 하여 26℃와 30℃에서 각각 배양한 후 조사한 결과 NPC agar와 DHL agar에서 그람양성세균 중에서 *B. cereus*와 *E. faecalis*가 각각 성장하였다. MacConkey agar와 SC-TS agar에서는 그람양성세균의 성장이 없었으며 그람음성세균 중에서 *Flavobacterium* sp.와 *Achromobacter lyticus*가 성장하지 못하였다.

그람음성세균을 평판당 100CFU/㎖이 되게 plate count agar, MacConkey agar와 SC-TS agar에 접종하여 배양한 후 plate count agar에서의 세균수에 대한 MacConkey agar와 SC-TS agar에서의 세균수의 비율을 조사하였다(Table 3). MacConkey agar에서 *Pseudomonas* 3 균주의 세균수가 낮아 성장이 상대적으로 억제되었으며 반면에 SC-TS agar에서는 성장이 좋았다. *Acinetobacter baumii*가 SC-TS agar에서 약간 성장이 억제되었다.

Table 2. Growth response of type culture of bacteria on selective agar

Bacteria	NPC agar	DHL agar	MacConkey agar	SC-TS agar
B. coagulans	-	-	-	-
B. cereus	+	-	-	-
S. aureus	-	-	-	-
L. invanovii	-	-	-	-
E. feacalis	-	+	-	-
E. coli	-	+	+	+
E. aerogenes	+	+	+	+
K. pneumoniae	+	+	+	+
Flavobacterium sp.	-	+	-	-
P. fluorescens	+	+	+	+
P. fluorescens	+	+	+	+
P. putida	+	+	+	+
A. lyticus	-	-	-	-
A. baumaii	+	+	+	+
A. faecalis	-	+	+	+

Table 3. Ratio of bacterial count of gram-nagative bacteria on selective agar against bacterial count on plate count agar for control

Bacteria	MacConkey agar (%)	SC-TS agar (%)
E. coli	107 ± 40	140 ± 34
E. aerogenes	108 ± 14	95 ± 14
K. pneumoniae	118 ± 44	110 ± 35
P. fluorescens	3 ± 2	107 ± 27
P. fluorescens	73 ± 27	162 ± 117
P. putida	26 ± 45	400 ± 369
A. baumaii	83 ± 43	29 ± 45
A. feacalis	67 ± 20	101 ± 1

Table 4. Growth response of gram-negative bacteria isolated from market milk with bacterial count more than 10^6 after storage at 7℃ for 10 days

Bacteria	No. of culture	No. of culture with growth		
		CFC agar	SC-TS agar	MacConkey agar
Pseudomonas fluorescens	7	7	7	7
Pseudomonas putida	3	1	2	2
Pseudomonas chloraphis	2	2	1	1
Acinetobacter junii	2	1	1	0
Acinetobacter lwoffi	1	0	0	1
Aeromonas hydrophilia	1	1	1	1
Moellerella wiscosensis	1	0	1	1
Seratia ficaria	1	0	1	1
Total	18	12	14	14

7℃에서 10일간 냉장한 후 세균수가 10^6CFU/㎖이상으로 증가한 시유에서 분리한 세균(Table 17)들을 CFC agar, SC-TS agar 및 MacConkey agar에 streaking 하여 성장 여부를 조사하였다(Table 4). CFC agar에서 *Pseudomonas putida* 3 균주 중에서 2 균주가 성장 못하고 *Acinetobacter lwoffi* 2 균주 중에서 1 균주가 성장 못하고 *Acinetobacter lwoffi*, *Moellerella wisconsensis* 및 *Seratia flcaria*가 성장하지 못하였다. SC-TS agar에서는 *Pseudomonas putida* 3 균주 중에서 1 균주가 *Pseudomonas chloraphis* 2 균주 중에서 1 균주가 *Acinetobacter chloraphis* 2 균주 중에서 1 균주 및 *Acinetobacter lwoffi* 1 균주가 성장하지 못하였다. MacConkey agar에서는 *Pseudomonas putida* 3 균주 중에서 1 균주가 *Pseudomonas chloraphis* 2 균주 중에서 1 균주가 *Acinetobacter junii* 2 균주가 성장하지 못하였다. CFC 배지가 다른 두배지에 비해 선택성이 높았으며 enterobacteria인 *Moellerella wisconsensis* 및 *Seratia ficaria*를 억제하는 것이 SC-TS agar와 MacConkey agar와 다른 특징이었다.

SC-TS 배지를 첨가하여 시유를 21℃, 25℃ 및 30℃에서 배양한 후에 resazurin을 첨가하고 30℃에서 배양하면서 resazurin의 변색시간을 조사여 그람음성세균의 2차오염을 조사하였다. 또한 동일한 시유를 7℃에서 10일간 배양한 후의 세균수를 조사하여 내냉성세균의 오염에 의한 시유의 저장성을 5월 11일 부터 9월 3일 까지 조사하였다(Table 5, 6, 7, 8 and

9).

Table 5. Resazurin reduction time after preliminary incubation with SC-TS broth and bacterial count after storage at 7℃ for 10 days of market milk produced in May 11, 1999

Type	Milk	Resazurin reduction time (hour)			Bacterial count (CFU/㎖)
		21℃	25℃	30℃	
LTLT	A	>10	>10	10.5	4,900
	B	>10	4.5	9.5	470,000
	C	>10	>10	9.5	4,200
	D	>10	>10	8.5	3,800
	E	6.5	1.5	2.5	46,000,000
	F	>10	>10	>10	8,100
	G	>10	>10	>10	$<10^2$
	H	>10	>10	>10	$<10^2$
	I	>10	>10	>10	$<10^2$
UHT	J	>10	4.5	>10	9,750,000
	K	>10	>10	>10	$<10^2$
	L	>10	6.5	1.5	3,110,000
	M	>10	>10	>10	12,000
	N	>10	2.5	7.5	1,200,000
	O	>10	>10	>10	110,000
	P	>10	>10	>10	$<10^2$
	Q	>10	>10	>10	$<10^2$

Resazurin 검사에서 10시간 이내에 변색하는 시유를 그람음성 세균에 의해 2차오염된 것으로 분류하였다. 7℃에서 10일간 저장한 후에 세균수가 10^5CFU/㎖ 이상인 시유는 내냉성 세균에 오염된 시유로 분류하였으며 10^6CFU/㎖ 이상인 시유는 내냉성 세균에 오염되었으며 저장성이 10일 이하인 우유로 분류하였다 (Table 10 and 11).

Resazurin 검사에서 우유의 예비배양 온도가 높을수록 대체로 10시간 이전에 변색되는 시료의 수가 증가하였다(Table 10). 특히 저온장시간살균유의 경우 30℃에서 예비배양하는 경우 10시간 이전에 변색하는 시유가 68 100%가 되어 내냉성, 중온성 및 고온성 그람음성세균에 의해 오염이 심한 것으로 추정되었다. 초고온순간살균유의 경우 25℃와 30℃에서 그람음성 세균에 의한 오염에 차이가 적어 고온성 그람음성 세균에 의한 오염이 적은 것으로 사료되었다.

7℃에서 10일 간 냉장한 시유의 세균수가 10^5CFU/㎖ 이상인 저온장시간 살균 시유의 비율이 6월과 7월에는 10%대로 낮으나 5월, 8월 및 9월에 40 60%로 높게 나타났다. 초고온순간 살균 시유는 5월, 6월, 7월에는 약 30%의 시유가 10^5CFU/㎖ 이상이었으나 가장 더운 8월에는 50%의 시유가 내냉성세균에 의해 오염된 것으로 나타났으며 저장성이 가장 악화되었다. 반면에 9월에는 0%로 낮아져 계절에 따라 민감하게 변화하였다. 세균수가 10^6CFU/㎖ 이상인 시유의 갯수는 10^5CFU/㎖ 이상인 시유의 갯수와 유사한 경향을 보였다(Table 10).

Resazurin 검사에서 변색시간이 10시간 이상 또는 미만인 시유와 이에 대한 냉장한 후의 세균수가 10^5CFU/㎖ 이상 또는 미만인 시유를 분류하여 4개의 집단에 속한 시유의 개수를 조사하였다(Table 11). 5월에 조사한 17개 시유에서 resazurin test에서 10시간 이내에 변색하고 세균수가 10^5CFU/㎖ 이상인 시유가 5개 이었다. 즉 이 시유들은 그람음성세균에 오염되었으며 또한 내냉성세균에 의해 오염된 우유들이다. 반면에 11개 시유는 그람음성세균 및 내냉성세균에 의해서 오염되지 않았다. 따라서 17개 시유중에서 그람음성세균의 오염 여부와 내냉성 세균의 오염 여부가 일치하는 시유가 16개 제품이며 전체 시유의 94%에 해당한다. 따라서 이 경우에 상당히 높은 확율로 resazurin 검사로 시유의 저장성을 예측할 수 있다.

그람음성세균의 오염을 에측하는 resazurin 검사와 내냉성세균의 오염을 추정하는 저장성 검사는 5월, 6월 및 9월에는 92-95%에서 일치하나 7월에는 77%이고 8월에는 58%로 매우 낮았다. 이의 원인으로는 7월과 8월 중에 시유가 내냉성 및 중온성 세균에 의한 오염이 심각한 것과 시유의 살균 온도의 상승에 의한 *Bacillus* 세균의 발아에 의해 저장성에 영향을 받기 때문에 resazurin 검사와 냉장저장 후의 세균수 검사가 일치하지 않는것으로 사료된다(Table 11).

Resazurin 검사에서 예비배양을 위한 배지로서 SG-TS 배지, DGN 배지 및 neutral red를 첨가하지 않은 MacConkey 배지를 사용하였다(Table 8). SG-TS 배지와 DGN 배지는 상호간에 유사한 resazurin reduction time의 분포를 보였으며 30℃에서 배양한 경우 21℃와 25℃ 보다 많은 시유가 10시간 이전에 resazurin이 변색하였다. 반면에 MacConkey 배지는 30℃에서 10시간 이전에 변색하는 배지와 21℃와 25℃에서 변색하는 배지가 상호 유사하여 MacConkey 배지가 30℃에서 배양할 때에 SG-TS 배지와 DGN 배지에 비해 그람음성세균 중에서 좁은 범위의 세균들이 성장할 수 있었다.

Table 6. Resazurin reduction time and bacterial count after storage at 7℃ for 10 days of market milk produced in June 30th

Type	Milk	Resazurin reduction time (hour)			Bacterial count (CFU/㎖)
		21℃	25℃	30℃	
LTLT	A	>10	>10	9.5	6,900
	A	>10	>10	9.5	4,300
	B	>10	>10	5.5	$<10^2$
	B	>10	7.5	7.5	$<10^2$
	C	>10	>10	>10	1,600
	C	>10	>10	>10	65,000
	D	>10	7.5	>10	$<10^2$
	D	6.5	0.5	0.5	1,700,000
	E	>10	>10	>10	$<10^2$
	E	7.5	7.5	>10	690,000
	F	4.5	0.5	0.5	25,000,000
	F	5.5	1.5	1.5	$<10^2$
	G	>10	>10	6.5	$<10^2$
	G	>10	>10	3.5	$<10^2$
	H	>10	5.5	1.5	$<10^2$
	H	>10	5.5	1.5	$<10^2$
	I	>10	>10	>10	$<10^2$
	I	>10	>10	>10	$<10^2$
	J	9.5	3.5	3.5	38,000,000
	J	9.5	3.5	3.5	44,000,000
	K	>10	>10	>10	2,700
	K	>10	>10	2.5	$<10^2$
	L	>10	7.5	>10	$<10^2$
	L	>10	7.5	>10	$<10^2$
	M	9.5	1.5	2.5	26,000
	M	>10	9.5	1.5	11,000,000
UHT	N	7.5	1.5	1.5	71,000,000
	N	7.5	1.5	1.5	53,000,000
	O	>10	9.5	>10	$<10^2$
	O	>10	>10	>10	$<10^2$
	P	>10	>10	>10	$<10^2$
	P	>10	>10	>10	$<10^2$
	Q	>10	>10	>10	$<10^2$
	Q	>10	>10	9.5	$<10^2$
	R	5.5	1.5	1.5	37,000,000
	R	6.5	1.5	1.5	52,000,000
	S	>10	>10	3.5	$<10^2$
	T	7.5	1.5	1.5	1,600,000

Table 7. Resazurin reduction time and bacterial count after storage at 7℃ for 10 days of market milk produced in July 29, 1999

Type	Milk	21℃	25℃	30℃	Bacterial count (CFU/㎖)
	A	>10	>10	0.5	15,000
	A	>10	3.5	>10	16,000
	B	>10	9.5	5.5	10,000
	B	>10	>10	2.5	12,000
	C	>10	>10	7.5	30,000,000
	C	>10	>10	0	20,000
LTLT	C	>10	>10	10.5	43,000
	D	7.5	4.5	0.5	18,000
	D	>10	>10	0	11,000
	F	7.5	7.5	3.5	18,000
	F	1.5	1.5	0	110,000
	G	>10	>10	>10	11,000
	G	>10	>10	2.5	14,000
	H	4.5	0.5	0	<100
	H	2.5	0.5	0	18,300
	I	>10	8.5	>10	<100
	I	>10	>10	1.5	<100
	J	0.5	0	0	22,000,000
	K	>10	>10	>10	<100
UHT	K	>10	>10	7.5	<100
	L	1.5	0	0	<100
	L	>10	>10	>10	8,600
	L	1.5	05	0	6,400,000
	M	>10	>10	>10	<100
	M	>10	>10	>10	<100
	N	>10	8.5	>10	<100

Table 8. Resazurin reduction time and bacterial count after storage at 7℃ for 10 days of market milk produced in August 11, 1999

Type	Milk	Resazurin reduction time (hour)									Bacterial count (CFU/㎖)
		SC-TS broth			DGN broth			MacConkey broth			
		21℃	25℃	30℃	21℃	25℃	30℃	21℃	25℃	30℃	
LTLT	A	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	3,700
	A	0.5	0.5	0.5	0.5	1.5	0.5	2.5	2.5	2.5	250,000
	B	>10	>10	5.5	>10	>10	4.5	>10	>10	>10	2,700,000
	B	>10	>10	3.5	>10	>10	5.5	>10	>10	>10	50,000
	C	2.5	>10	2.5	>10	3.5	2.5	3.5	>10	>10	3,700
	C	2.5	3.5	0.5	3.5	1.5	1.5	3.5	4.5	3.5	300,000
	D	>10	>10	4.5	>10	>10	5.5	>10	>10	>10	4,700
UHT	J	2.5	1.5	0.5	2.5	2.5	0.0	3.5	4.5	2.5	22,000,000
	E	1.5	1.5	1.5	2.5	2.5	0.5	3.5	4.5	1.5	<100
	F	>10	>10	2.5	>10	>10	2.5	>10	>10	>10	9,300,000
	F	5.5	5.5	2.5	5.5	5.5	1.5	8.5	>10	3.5	1,200,000
	G	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	66,000
	G	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	1,600
	G	8.5	>10	2.5	6.5	7.5	2.5	7.5	6.5	4.5	<100
	H	>10	>10	5.5	8.5	7.5	0.0	>10	>10	>10	2,800,000
	H	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	900
	I	>10	3.5	>10	>10	>10	4.5	2.5	>10	>10	4,300,000
	I	>10	>10	>10	>10	8.5	>10	>10	>10	>10	230,000
	J	>10	>10	>10	>10	8.5	>10	>10	>10	>10	<100

SC-TS 배지와 DGN 배지와 혼합하여 30℃에서 resazurin이 변색된 시유에서 세균을 분리하여 그람 염색하여 조사한 결과 SC-TS 배지에서 예비배양한 시유에서는 그람음성 세균만이 검출되었으며 DGN 배지에서는 그람음성세균이 대부분이었으나 일부 시유에서 그람양성 간균과 구균이 검출되었다. 이러한 결과는 DGN 배지의 그람음성세균의 선택성이 높지 않아 그람음성세균의 오염 여부에 있어 DGN 배지가 그릇된 결정을 유도할 수 있으므로 resazurin 검사에 사용하기에 부적절하다고 사료되었다.

Table 9. Resazurin reduction time and bacterial count after storage at 7℃ for 10 days of market milk produced in September 3, 1999

Type	Milk	Resazurin reduction time (hour)						Bacterial count (CFU/㎖)
		SC-TS broth			CFC Broth			
		21℃	25℃	30℃	21℃	25℃	30℃	
	A	6.5	>10	2.5	>10	7.5	>10	22,000,000
	A	6.5	1.5	0.5	>10	3.5	10.5	14,000,000
LTLT	A	>10	10.5	6.5	>10	>10	>10	4,000
	A	>10	3.5	2.5	>10	>10	>10	4,400
	A	6.5	1.5	0.5	>10	5.5	>10	2,000,000
	B	>10	>10	>10	>10	>10	>10	<100
	B	>10	>10	>10	>10	>10	>10	<100
	B	>10	6.5	>10	>10	>10	>10	<100
	B	>10	>10	5.5	>10	>10	>10	<100
	B	>10	10.5	>10	>10	>10	>10	<100
	C	>10	>10	>10	>10	>10	>10	<100
	C	>10	>10	>10	>10	>10	>10	<100
UHT	C	>10	9.5	10.5	>10	>10	>10	<100
	C	5.5	7.5	2.5	>10	>10	>10	<100
	C	>10	>10	>10	>10	>10	>10	<100
	D	>10	9.5	1.5	>10	>10	>10	<100
	D	>10	7.5	>10	>10	>10	>10	<100
	D	>10	>10	4.5	>10	>10	>10	<100
	D	>10	>10	3.5	>10	>10	>10	<100
	D	>10	>10	2.5	>10	>10	>10	<100

Resazurin 검사에서 예비배양하는 배지로서 SC-TS 배지와 CFC 배지를 사용하였다(Table 9). SC-TS 배지를 사용하여 21℃에서 예비 배양하는 경우에 저온장시간 살균 시유에서 resazurin 검사와 냉장저장 후의 세균수가 10^6CFU/㎖ 이하인 시유가 상호간에 일치하였으나 초고온순간 살균 시유에서는 resazurin 검사에서 21℃에서 예비 배양할 때에 그람음성세균으로 오염된 시유가 1제품이 있었으나 7℃에서 10일 간 저장한 후의 세균수는 100CFU/㎖ 미만으로 나타나 내냉성세균의 오염이 없었던 것으로 나타나 상호 방법간에 일치하지 않았다.

CFC 배지와 혼합하여 예비배양한 경우에 25℃에서 10시간에 이전에 변색한 시유와 냉장저장 후의 세균수가 10^6CFU/㎖ 이하인 시유와 일치하였다. 또한 초고온 순간 살균시유에서는 모든 예비배양온도에서 10시간내에 변색하지 않았으며 이는 냉장온도에서 세균수와 일치하는 결과 이었다. CFC 배지는 *Pseudomonas*에 대해 선택성이 있는 배지이나 *Enterobacter*도

성장할 수 있으며 냉장 저장한 시유에서 분리한 *Aeromonas*와 *Acinetobacter*가 성장할 수 있다. CFC는 SC-TS 배지 보다 내냉성 그람음성세균에 대해 선택성이 있는 배지로서 여름철에 생산된 오염이 심각한 시유의 저장성을 추정할 수 있는 배지로서 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 10. The percentage of market milk which had resazurin reduction time less than 10 hour after preliminary incubation with SC-TS broth and the percentage of market milk with bacterial count more than 10^5 and 10^6 CFU/㎖ after storage at 7℃ for 10 days

Mfg. date	Type	No of milk	Resazurin reduction time <10 hour (%)			Bacteria count >10^5CFU/㎖ (%)	Bacterial count >10^6CFU/㎖ (%)
			21℃	25℃	30℃		
May 11	LTLT	5	20	40	100	40	20
	UHT	12	0	25	17	33	25
Jun 30	LTLT	16	25	50	69	19	13
	UHT	23	35	52	52	35	35
Jul 29	LTLT	13	23	38	85	15	7
	UHT	19	37	58	53	26	21
Aug 11	LTLT	7	42	29	86	43	14
	UHT	12	33	33	50	50	42
Sep 3	LTLT	5	60	80	100	60	60
	UHT	15	20	40	46	0	0

Table 11. Classification of market milk based on resazurin reduction time and bacterial count

Mfg date	No. of milk	Temperature in resazurin test	Resazurin reduction time / Bacterial count* (No. of milk)				Milk with same response
			+/+	+/-	-/+	-/-	
May 11	17	25℃	5	0	1	11	94%
Jun 30	39	21℃	11	2	1	25	92%
Jul 29	26	21℃	3	5	1	17	77%
Aug 11	19	21℃	4	3	5	7	58%
Sep 3	20	21℃	3	1	0	16	95%

* Resazurin reduction time less than 10 hour : + , Resazurin reduction time more than 10 hours : -, Bacterial count more than 10^5CFU/㎖ : /+ , Bacterial count less than 10^5CFU/㎖ : /-

1999년 6월부터 8월까지 구입한 우유를 7℃에서 10일간 저장한 후 세균수가 10^6 CFU/㎖ 이상인 시유에서 세균을 분리하여 그람음성세균을 API 20E와 API 20NE를 이용하여 동정하였다(Table 12, 13, 14, 15, 16). 동정된 세균을 분리된 시유 제품명에 따라 분류하였다 (Table 17). 특히 시유 A, D 및 E는 6월, 7월 및 8월에 생산된 시유에서 분리한 균주를 동정한 결과이었다. 시유 B는 6월에 생산된 시유에서 분리한 세균을 동정하였다. 시유 D은 저온장시간 살균 시유이었으며 나머지 시유는 초고온순간살균 시유이었다. 시유 A와 시유 E는 동일 유가공장에서 생산되었으며 시유 A는 여러 종류의 기능성 성분이 첨가되어 생산되는 제품이었다.

시유에서 분리한 28 균주 중에서 2 균주가 그람양성 간균과 구균이었다. API 20E와 API 20NE로 동정한 전체 그람음성세균 26 균주 중에서 14 균주가 *Pseudomonas*이고 비율이 50% 이상이었으며 다음으로 *Acinetobacter*와 *Aeromonas* 이었다. 시유 B제품의 동정안된 3균주도 *Aeromonas*와 유사하였다. Enterobacteria에 속하는 균주는 *Moellerella wisconsensis*, *Seratia ficaria* 및 동정 안된 1 균주를 합하여 3균주이었으며 나머지 23 균주는 호기성 그람음성세균이었다.(Table 17)

시유 A과 D제품이 다양한 그람음성세균에 의해 오염되어 있었으며 시유 C과 E는 *Pseudomonas*에 의해 오염되었다. 시유 B는 *Pseudomonas chloraphis* 1 균주와 동정하지 못한 3 균주에 의해 오염되었으며 이 균주들의 생화학적 반응이 유사하여 동일한 세균으로 보였다(Table 13).

Table 12. Identification by using API 20NE of gram negative bacteria isolated from market milk stored at 7℃ for 10 days

TESTS	A28A7	A29A7	A40A7	A24B7	A11C7B	A12C7Y	A12C7W
Reduction of nitrate	-	-	-	-	+	-	-
Indole produtions	-	-	-	-	-	-	-
Glucose acidification	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	-	-	+	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-
β-Glucosidase	-	-	-	-	+	+	-
Protease	-	+	-	-	+	+	-
β-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	+
Assimilation of							
Glucose	+	+	-	-	+	-	+
Arabinose	+	+	-	-	-	-	-
Mannose	-	+	-	-	-	-	-
Mannitol	-	+	-	-	-	-	-
N-acetyl-glucosamine	-	+	-	-	+	-	-
Maltose	-	-	-	-	+	-	+
Gluconate	+	+	-	-	+	-	-
Caprate	+	+	+	+	-	-	-
Adipate	-	-	+	-	-	-	-
Malate	+	+	+	+	+	-	-
Citrate	+	+	-	+	+	-	-
Phenyl-acetate	-	-	+	-	-	-	-
Cytochrome oxidase	-	+	-	-	+	+	+
Identification*	Pp	Pf	Al	Aj	As	nd	Pv

* Pp: *Pseudomonas putida*, Pf: *Pseudomonas fluorescens*,
Al : *Acinetobacter lwoffii*, Aj : *Acinetobacter junii/johnsonii*,
As : *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, nd: Not determined,
Ps : *Pseudomonas vesicularis*

Table 13. Identification by using API 20NE of gram negative bacteria isolated from market milk stored at 7°C for 10 days

TESTS	B36A7A	B36A7B	B37A7	B29B7	C28B7	C18C7
Reduction of nitrate	-	-	-	-	-	+
Indole prodution	-	-	-	-	-	-
Glucose acidification	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	+	-
Urease	-	-	-	-	-	-
β-Glucosidase	+	+	+	-	-	-
Protease	+	+	+	-	+	-
β-Galactosidase	+	+	+	-	-	-
Assimilation of						
Glucose	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	+	+	+
Mannose	-	-	-	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
N-acetyl-glucosamine	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+	+
Caprate	-	-	-	+	+	+
Adipate	-	-	-	-	-	-
Malate	-	-	-	+	+	+
Citrate	-	-	-	+	+	+
Phenyl-acetate	-	-	-	-	-	-
Cytochrome oxidase	+	+	-	-	-	+
Identification*	nd	nd	nd	Pc	Pa	Pf

* nd: Not determined, Pc: *Pseudomonas chloraphis*, Pa: *Pseudomonas aureofaciens*, Pf: *Pseudomonas fluorescens*

Table 14. Identification by using API 20NE of gram negative bacteria isolated from market milk stored at 7°C for 10 days

TESTS	D8A7	D10A7A	D10A7B	D5B7	D11B7
Reduction of nitrate	-	-	-	+	-
Indole prodution	-	-	-	+	-
Glucose acidification	-	-	-	+	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	-	-
Urease	-	-	-	-	-
β-Glucosidase	-	-	-	+	-
Protease	+	-	-	+	-
β-Galactosidase	-	-	-	+	-
Assimilation of					
Glucose	+	+	+	+	-
Arabinose	+	-	-	+	-
Mannose	+	+	+	+	-
Mannitol	+	-	-	+	-
N-acetyl-glucosamine	+	-	-	+	-
Maltose	-	-	-	+	-
Gluconate	+	+	+	+	-
Caprate	+	+	+	+	+
Adipate	-	-	-	-	+
Malate	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	-	+
Phenyl-acetate	-	-	-	-	-
Cytochrome oxidase	+	-	+	+	-
Identification*	Pf	Pp	Pf	Ah	Aj

* Pf: *Pseudomonas fluorescens*, Pp: Pseudomonas putida, Ah: *Aeromonas hydrophilia/caviae*, Aj: *Acinebacter junii/johnsonii*,

Table 15. Identification by using API 20NE of gram negative bacteria isolated from market milk stored at 7℃ for 10 days

TESTS	E20A7	E21A7	E15B7	E18B7	E9C7
Reduction of nitrate	-	-	-	-	-
Indole prodution	-	-	-	-	-
Glucose acidification	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Urease	-	+	-	-	-
β-Glucosidase	-	-	-	-	-
Protease	+	+	+	+	+
β-Galactosidase	-	-	-	-	-
Assimilation of					
Glucose	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+
N-acetyl-glucosamine	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+
Caprate	+	+	+	+	+
Adipate	-	-	-	-	-
Malate	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+
Phenyl-acetate	-	-	-	-	-
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+
Identification*	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf

* Pf: *Pseudomonas fluorescens*

Table 16. Identification by using API 20E of gram negative bacteria isolated from market milk stored at 7℃ for 10 days

Tests	A27A7	DA12A7	D8C7
β-Galactosidase	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	+	-
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Citrate utilization	-	-	+
H_2S production	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophane desaminase	-	-	-
Indole production	-	-	-
Acetoin production	+	-	+
Gelatinase	-	-	+
Fermentation/oxidation of			
Glucose	+	+	+
Mannitol	-	+	+
Inositol	-	-	+
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	+
Sucrose	+	+	+
Melibiose	+	-	-
Amygdalin	-	+	+
Arabinose	-	+	+
Cytochrome oxidase	-	-	-
Nitrate production	-	+	+
Reduction to N_2 gas	-	-	-
Motility	nd	nd	+
McConkey medium	-	+	+
Fermentation of glucose	+	+	+
Oxidation of glucose	+	+	+
Identification	Mw	nd	Sf

* Mw: *Mollerella wiscosensis*, Sf: *Seratia ficaria*,
Nd : not determined

Table 17. Bacteria isolated from market milk which had bacterial counts more than 10^6CFU/㎖ after storage at 7℃ for 10days

Bacteria	Market milk					Total
	A	B	C	D	E	
Pseudomonas fluorescens	1		1	2	5	9
Pseudomonas putida	1			1		2
Pseudomonas aureofaciens			1			1
Pseudomonas chlororaphis		1				1
Pseudomonas vesicularis	1					1
Acinetobacter junii/johnsonii	1			1		2
Acinetobacter lwoffii	1					1
Aeromonas hydrophilia/caviae				1		1
Aeromonas salmonicida ssp. *salmonicida*	1					1
Moellerella wiscosensis	1					1
Seratia ficaria				1		1
Not determined	1	3		1		5

SC-TS 배지와 혼합하여 21℃에서 18시간 배양한 후 resazurin 검사에서 10시간 이내에 변색한 시유로부터 그람음성세균을 분리하여 동정하였다. 분리된 세균이 총 25균주이고 모두 그람음성 세균이었으며 이 중 21균주를 동정하였다 (Table 18, 19, 20, 21). 이 중 7균주가 *Acinetobacter*, 5균주가 *Pseudomonas*, 4균주가 *Enterobacter*, 나머지가 각각 *Chryseomonas luteola*, *Klebsiella oxytosa*, *Sphmon. pauciomobilis* 1균주이었으며 나머지는 2균주는 동정이 안되었다. Enterobacteria에 속하는 균주가 Enterobacter 3 균주, *Klebsiella oxytosa*과 *Sphmon. pauciomobilis* 각각 1균주를 합하여 5균주 이었으며 나머지가 호기성 그람음성세균에 속하였다 (Table 22). 이는 7℃에서 냉장저장한 우유에서 분리한 균주들과 차이를 보였으며 *Pseudomonas*가 감소하고 *Enterobacter*가 분리된 점이 달랐다. 이는 SC-TS 배지의 영향때문이기 보다는 배양온도의 상승에 의한 중온성 세균의 성장 촉진때문이라고 생각된다. 이러한 결과로부터 여름철 생산된 시유는 소수의 그람음성세균에 의해 2차오염되기 보다는 다양한 종류의 그람음성세균으로 오염됨을 알 수 있었다. 따라서 21℃에서 시유를 예비배양하는 resazurin 검사와 7℃에서 냉장저장한 후의 세균수 측정

결과가 일치하기 어려울 것으로 사료된다.

Table 18. Identification by using API 20NE of gram negative bacteria isolated from market milk which was mixed with SC-TS broth and incubated at 21℃ for 18 hours

TESTS	A26A21	A28A21A	A28A21B	B36A21	B37A21	B32B21A
Reduction of nitrate	-	+	+	-	-	-
Indole prodution	-	-	-	-	-	-
Glucose acidification	-	+	-	+	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	+
Urease	-	-	-	-	-	-
β-Glucosidase	-	+	-	-	-	-
Protease	-	-	-	-	-	+
β-Galactosidase	-	+	-	-	-	-
Assimilation of						
Glucose	-	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	+	+	+	+
Mannose	-	-	-	-	-	+
Mannitol	-	+	+	-	-	+
N-acetyl-glucosamine	-	+	-	-	-	+
Maltose	-	-	+	-	-	-
Gluconate	-	-	+	-	-	+
Caprate	+	+	+	+	+	+
Adipate	-	-	+	+	+	-
Malate	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	-	+	+	+
Phenyl-acetate	-	+	-	+	+	-
Cytochrome oxidase	-	-	+	-	-	-
Identification	Aj	nd	Ps	Ab	Ab	Pa

* Aj; *Acinetobacyter junii/johnsonii*, Ps: *Pseudomonas stutzeri*, Ab. *Acinetobacter baumaii*, Pa: *Pseudomonas aureofaciens*

Table 19. Identification by using API 20NE of gram negative bacteria isolated from market milk which was mixed with SC-TS broth and incubated at 21 °C for 18 hours

TESTS	D10A21A	D10A21B	D11A21	D12A21A	D21A21B	D8B21	E21A21
Reduction of nitrate	-	-	-	+	-	-	-
Indole prodution	-	-	-	-	-	-	-
Glucose acidification	-	-	-	+	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	-	-	-	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-
β-Glucosidase	-	-	-	+	-	-	-
Protease	-	-	-	-	-	-	+
β-Galactosidase	-	-	-	+	-	-	-
Assimilation of							
Glucose	+	+	+	+	+	-	+
Arabinose	+	-	-	+	+	-	+
Mannose	+	+	-	+	-	-	+
Mannitol	+	-	-	+	-	-	+
N-acetyl-glucosamine	-	-	-	+	-	-	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	-	+	-	-	+
Caprate	+	+	+	-	+	+	+
Adipate	-	-	-	-	+	-	-
Malate	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	-	+	+	+	+
Phenyl-acetate	-	-	-	-	+	-	-
Cytochrome oxidase	+	+	-	-	-	+	+
Identification	Pf	Pp	Aj	Cl	Ab	nd	Pf

* Pf: *Pseudomonas fluorescens*, Pp: *Psuedomonas putida*, Aj: Acinetobacter junii/*johnsonii*, Cl: *Chryseomonas luteola*, Ab: *Acinetobacter baumaii*, nd: not determined

Table 20. Identification by using API 20E of gram negative bacteria isolated from market milk mixed withe cetrimide-deoxycholate broth and incubated at 21°C for 18 hours

Tests	A24B21	B32B21B	B37A21	C18M21
β-Galactosidase	-	+	-	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	+
Citrate utilization	-	-	-	-
H_2S production	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Tryptophane desaminase	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-
Acetoin production	-	+	-	+
Gelatinase	-	+	-	-
Fermentation/oxidation of				
Glucose	+	-	+	+
Mannitol	-	-	-	+
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	+
Rhamnose	-	-	-	+
Sucrose	-	-	-	+
Melibiose	+	-	+	+
Amygdalin	-	-	-	+
Arabinose	+	-	+	+
Cytochrome oxidase	-	-	-	-
Nitrate production	-	-	-	+
Reduction to N_2 gas	-	-	-	-
Motility	nd	nd	nd	nd
McConkey medium	+	+	+	nd
Fermentation of glucose	+	+	+	+
Oxidation of glucose	+	+	+	+
Identification	As	Sp	As	Ei

* As: *Acinetobacter* sp., Sp: *Sphmon. pauciomobilis*,
Ei: *Enterobacter intermedius*

Table 21. Identification by using API 20E of gram negative bacteria isolated from market milk mixed withe cetrimide-deoxycholate broth and incubated at 21℃ for 18 hours

Tests	C28B21	D23A21A	E18B21A	E18B21B
β-Galactosidase	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	-	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	+	-
Ornithine decarboxylase	+	+	-	+
Citrate utilization	+	-	+	+
H_2S production	-	-	-	-
Urease	-	-	+	-
Tryptophane desaminase	-	-	-	-
Indole production	-	-	+	-
Acetoin production	+	-	-	+
Gelatinase	-	-	-	-
Fermentation/oxidation of				
Glucose	+	+	+	+
Mannitol	-	+	+	+
Inositol	-	-	+	-
Sorbitol	+	+	+	-
Rhamnose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+
Cytochrome oxidase	-	-	-	-
Nitrate production	+	+	+	+
Reduction to N_2 gas	-	-	-	-
Motility	nd	+	nd	nd
MacConkey medium	+	+	+	+
Fermentation of glucose	+	+	+	+
Oxidation of glucose	+	+	+	+
Identification	Ec	Ei	Ko	Es

* Ec: *Enterobacter cloaceae*, Ei: *Enterobacter intermedius*, Ko: *Klebsiella oxytosa*, Es: *Enterobacter sakazakii*

Table 22. Bacteria isolated from market milk which incubated at 21℃ for 18 hours after adding SC-TS broth

Bacteria	Market milk					Total
	A	B	C	D	E	
Acinetobacter baumaii		2		1		3
Acinetobacter junii/johnsonii	1			1		2
Acinetobacter sp.	1	1				2
Pseudomonas fluorescens				1	1	2
Pseudomonas aureofaciens		1				1
Pseudomonas putida				1		1
Pseudomonas stutzeri	1					1
Enterobacter cloacae			1			1
Enterobacter intermedium			1	1		2
Enterobacter sakazakii					1	1
Chryseomonas luteola				1		1
Klebsiella oxytosa					1	1
Sphmon. pauciomobilis		1				1
Not determined	1			1		2

4. 적 요

SC-TS 배지를 이용한 resazurin 환원시간 검사방법의 국산 시유에 적용함에 있어 타당성을 조사하고 2차오염이 일어난 국산 시유로부터 그람음성세균을 동정하였다. SC-TS agar는 그람양성세균의 성장을 억제하고 SC-TS 배지를 시유와 혼합하여 21℃, 25℃ 및 30℃에서 배양한 resazurin 환원시간 검사에서 그람양성세균이 검출되지 않았다. 5월, 6월 및 9월에 생산된 시유는 resazurin 환원시간 검사와 냉장저장 후의 세균수 측정 검사가 상호간 매우 일치하는 결과를 보였으나 7월과 8월에 생산된 시유는 resazurin 환원시간 검사와 냉장저장 후의 세균수가 측정 검사가 상당히 차이를 나타냈다. 저온장시간살균유는 그람음성세균에 의한 오염이 높았으며 초고온순간살균유는 제품과 계절에 따라 변화하였다. 냉장저장한 후 10^6CFU/㎖ 이상의 세균수를 나타내는 시유에서 분리하여 동정한 세균은 *Pseudomonas*가 전체 동정한 세균의 50%를 초과하였으며 다음으로 *Acinetobacter*와 *Aeromonas*이었으며 21℃에서 SC-TS 배지와 혼합하여 배양한 시유에서는 *Acinetobacter*, *Pseudomonas* 및 *Enterobacter*가 다수 동정되었다.

제 6 절 16S rDNA의 PCR 합성을 이용한 그람음성세균의 검출과 시유의 2차오염에의 응용

SUMMARY

A method to detect gram-negative bacteria up to 2 CFU was developed by using PCR-amplication of 16S rDNA. PCR with primer pairs of GNF1 and GNR2, UNIV and GNR2, and GNF2 and GNR2 amplified 16S rDNA from purified DNA of *Pseudomonas fluorescnes* but not *Enterococcus faecalis*. 16S rDNA was amplified from LTLT-pasteurized milk and UHT-pasteurized milk by using semi-nested PCR. 16S rDNA was amplified from LTLT-pasteurized milk which was added with *P. fluorescens* and heated at 65℃, 80℃, 100℃ for 30 min but not from that autoclaved at 121℃ for 15min. 16s rDNA was amplified from gram-negative bacteria except *Achromobacter lyticus* and *Alcaligens faecalis* but not from gram-positive bacteria.

(Key words ; PCR, 16S rRNA, Gram-negative bacteria, Market milk)

1. 서 론

우유의 2차오염 검출과 저장성 측정법에서 사용하는 그람음성 내냉성세균의 생장을 촉진하는 예비배양 대신에 PCR 방법을 이용하여 그람음성 내냉성세균의 DNA만을 증폭하여 검출함으로서 예비배양은 하지않고 신속하게 그람음성 내냉성세균의 존재여부를 결정할 수 있다.

Polymerase chain reaction(PCR)에서 그람음성세균에 특이성이 있는 primer를 사용하여 DNA 절편을 증폭하여 검출하므로서 신속하게 그람음성세균의 존재 여부를 결정할 수 있다. PCR 방법의 민감도와 특이성이 개선된 nested PCR 방법(Herman, 등, 1995)과 PCR 방법과 함께 Ligase Chain Reaction (LCR) (Wiedmann, 1992, Wiedmann, 1993) 또는 Nucleic Acid Sequence-Based Amplication (NASBA) (Uyttendaele, 1995)을 병행하여 분석하는 방법이 개발되었다.

PCR 방법은 식품 미생물에 적용할 수 있는 방법으로서 개발되어 왔다. PCR 방법에 사용되는 primer들의 염기서열은 증폭하려는 DNA 영역의 염기서열로 부터 결정된다. 미생물의 동정을 위해 사용된 primer의 염기서열은 미생물에 의한 발병에 관련된 유전인자 또는 모든 미생물에 존재하는

유전인자 중 비보존영역을 이용하여 결정되었다. 예를 들어 *Listeria monocytogenes*의 병원성과 관련된 유전인자인 *prfA*, *hlyA* (listeriolysin O) 및 *plcC* (phospholipase C)의 DNA 절편을 PCR으로 증폭하여 검출되었다 (Cooray 등, 1994). 이외에 병원성 유전인자를 이용하여 PCR 방법으로 검출한 병원균들에는 *Yersinia enterocolitica* (Rasmussen 등, 1995) 및 *Salmonella typhi* (Hashimoto 등, 1995) 등이 있다.

Ribosomal RNA와 특정 단백질의 유전자의 염기서열은 유전자의 부위에 따라 생물체 간에 동일하여 공통된 염기서열을 가지거나 반대로 종간에도 염기서열이 다르다 (Woes, 1987). 세균의 그람염색반응에 따라 또는 속종에 따라 16S rRNA을 바탕으로 염기서열이 다른 oligonucleotide를 설계하여 hybridization 또는 PCR의 probe와 primer로서 사용하여 archaebacteria, eubacteria, eucaryote, 그람음성균 및 그람양성균을 비롯하여 세균의 속과 종을 동정할 수 있다 (Giovannoi 등, 1988, Greisen 등, 1993). 따라서 그람음성세균에 특이성이 있는 primer의 염기서열을 16S rRNA로 부터 찾을 수 있다.

PCR을 사용하여 생균과 사균을 분별할 수 있는가에 대한 연구가 일부 되어 있다. 70°C에서의 가열 또는 염소제 살균제로서 사멸된 *Legionella pneumophilia* 세균으로 부터는 PCR을 사용하여 DNA를 증폭할 수 없었다 (Bej 등, 1991). 이는 세균이 사멸시 DNA가 신속하게 분해됨을 뜻한다.

본 연구의 목적은 우유에 2차오염된 그람음성 내냉성균을 직접 검출하기 위한 PCR 방법을 개발하고 우유의 가열온도와 시간에 따른 세균의 DNA의 PCR 증폭 여부를 조사하고 생균과 사균을 분별할 수 있는 PCR 방법을 개발하는 것이다.

2. 재료 및 방법

가. 세균 균주

본 실험에 사용한 균주 중 *Lactococcus* sp.는 Chr. Hansen's사 (Denmark)의 치즈 스타터(R-703)로부터 분리하였으며 다른 세균은 생명공학연구소 유전자은행으로부터 구입하였다 (Table 1). *Pseudomonas* 균주들은 26°C에서 그외 다른 세균들은 30°C에서 24시간 동안 2회 계대 배양한 후 배양에 사용하였다.

Table 1. Bacteria used in the study

Bacteria	Sources
Bacillus cereus	KCTC 1013
Staphylococcus aureus	KCTC 1928
Enterococcus faecalis	KCTC 3512
Lactococcus sp.	Chr. Hansen's R-703
Escherichia coli	KCTC 2441
Klebsiella pneumoniae	KCTC 2001
Enterobacter aerogenes	KCTC 2190
Pseudomonas fluorescens	KCTC 2344
Pseudomonas fluorescens	KCTC 1767
Pseudomonas putida	KCTC 1644
Achromobacter lyticus	KCTC 2336
Acinetobacter baumaii	KCTC 2508
Alkaligens faecalis	KCTC 2678

나. DNA의 분리 및 정제

세균으로부터 Versalovic 등(1991)의 방법에 따라 genomic DNA를 분리하였다. Tryptic soy agar에서 24시간 배양한 후 형성된 균총을 긁어내어 PBS용액에 분산하였다. 7,000rpm에서 10분간 원심분리하여 세균체를 침전시켰다. 1㎖의 1M NaCl용액으로 한차례 세척하고 50mM TE 용액(50mM Tris, 50mM EDTA, pH 7.8)으로 두차례 세균을 세척한 후 0.45㎖의 10mM TE용액(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.8)에 분산시키고 25㎕의 mutanolysin(5,000 unit/㎖ 10mM TE 용액)와 25㎕의 RNase A(6mg/ml 10mM Tris, 15mM NaCl, pH 7.8)을 가하고 37℃에서 1시간 배양하였다. 30㎕의 SDS(10%)와 30㎕의 proteinase K(10mg/ml, 10mM TE 용액)을 가하고 55℃에서 2시간 배양하였다. Phenol(0.4㎖)을 가하고 섞은 후 소형원심분리기에서 1분간 원심분리하였다. 상부의 수용액층을 다른 튜브에 옮기고 phenol으로 추출을 반복하였으며 chloroform(0.4㎖)으로 2회 추출하였다. 수용액 층에 10mM TE 용액을 가하여 0.4㎖으로 만든 후 40㎕의 3M sodium acetate(pH 5.2)를 가하고 0.8㎖의 냉각된 ethanol을 가하고 섞은 후 -20℃에서 2시간 이상 유지하였다. 용액을 2분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전된 DNA를 냉각된 70% ethanol으로 세척하고 적당한 양의 10mM TE 용액으로 용해하였다. DNA 용액을 앞에 방법에 따라 반복하여

RNase A 및 proteinase K와 SDS로 처리하고 phenol과 chloroform으로 추출하였고 다시 3M sodium acetate(pH 5.2)와 ethanol로 침전하여 DNA를 정제하였다.

다. DNA의 간이 추출

DNA를 간단히 분리하는 방법으로서 3종류의 방법을 시도하였다.

첫째는 Boiling 법이었다. 세균분산액 1㎖를 원심분리관에 분주한 후 10,000 × g에서 원심분리하였다. 상등액을 버리고 200㎕의 TE buffer(10mM Tris, pH 8.0 1mM EDTA)에 분산하였다. 끓는 물에 15분간 가열한 다음에 4㎕를 PCR에 사용하였다.

둘째는 lysis buffer 법이었다. 세균분산액 1㎖를 원심분리관에 분주하고 10,000 × g에서 5분간 원심분리하였다. 침전된 세균에 200㎕의 lysis buffer(2% triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 1mM EDT, 10mM Tris, pH8.0)에 넣은 후 vortex하였다. Phenol : chloroform isoamyl alcohol (25:24:1)을 200㎕를 놓은 후 10 분간vortex한 후 5분간 원심분리하였다. 상등액을 새 시험관에 옮긴 후 600㎕의 ethanol과 20㎕의 3M sodium acetate를 넣고 vortex한 다음 원심분리하였다. 70% ethanol로 세척한 후 상등액을 버리고 건조하고 50㎕ 증류수를 가하여 용해하였다. 4㎕를 PCR에 사용하였다.

셋째로 bead beater 법이다. 세균 분산액 1㎖를 원심분리관에 분주하고 원심분리하여 침전된 균체에 200㎕의 lysis buffer, 200㎕의 phenol : chloroform isoamyl alcohol (25:24:1)과 0.3g의 산세척된 glass bead(0.45 0.52 micron)을 가하였다. Bead beater를 이용하여 2분간 진탕한 다음 5분간 원심분리하였다. 상등액을 옮긴 후 600㎕의 ethanol과 20㎕의 3M sodium acetate를 넣고 vortex한 다음 10분간 원심분리하였다. 70% ethanol로 세척한 후 상등액을 버리고 건조시킨 다음에 50㎕의 증류수에 녹였다. 4㎕를 PCR에 사용하였다.

라. 시유의 전처리

UHT-살균 시유와 LTLT-살균 시유 1㎖를 10,000 × g에서 10분간 원심분리한 후에 침전된 균체 1㎖의 PBS로 세척하고 200㎕의 TE buffer에 분산한다. 100℃에서 5분간 열처리한 후 4㎕를 PCR에 사용하였다.

마. 시유의 *P. fluorescens*의 첨가와 열처리

LTLT-살균 시유 1㎖에 10^6CFU의 *P. fluorescens*를 첨가하였다. 10,000 × g에서 10분간 원심분리한 후에 침전된 균체를 1㎖의 PBS로 세척하고 200㎕의 TE buffer에 분산하였다. 0.1U, 1U 및 5U의 DNase(Boehringer

Mannaheim)를 첨가하고 37℃에서 1시간 반응하였다. 반응 후에 100℃에서 15분간 열처리한 다음 4㎕를 PCR에 사용하였다.

바. PCR 및 전기영동

PCR 증폭을 위한 25㎕ PCR 반응액은 50mM Tris, pH 8.3, 10mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 200 μM dNTP, 1U Taq polymerase, 100nM primer 및 100ng DNA 또는 4㎕ 세균추출액를 함유하게 만들었다. Perkin-Elmer thermal cycler을 이용하여 94℃에서 5분간 가열한 후에 94℃에서 1분, 62℃에서 1분 그리고 72℃에서 2분을 1 cycle로 하여 35 cycle 증폭하고 마지막으로 72℃에서 3분간 가열한 후에 4℃에서 저장하였다.

Semi-nested PCR 증폭은 위와 같은 반응액을 가지고 수행하였으며 1차 PCR에서는 GNF1과 GNR2 primer를 사용하고 2차 PCR에서는 GNF2와 GNR2 primer를 사용하였다. 2차 PCR에서는 30회 cycle 증폭하였다.

PCR로 증폭된 DNA는 2% agarose gel, 1×TAE buffer, 70V에서 전기영동하였다. DNA 염색은 ethidium bromide로 하였다.

III. 결과 및 고찰

그람양성세균들과 그람음성세균들의 16S rDNA의 염기순서를 조사하여 그람음성세균에 특이적인 염기배열의 oligonucleotide를 찾았다. 그람음성세균에 대해 특이적인 primer로서 그람음성세균들 간에는 공통이고 그람양성세균과는 염기가 다른 oligonucleotide를 설계하였다 (Table 2). 순상 primer로서 GNF1와 GNF2는 그람음성세균의 염기서열을 갖고 있으며 UNIV는 그람양성세균과 그람음성세균이 공통으로 갖고 있는 염기서열의 primer이다. 역상 primer로서 GNR2는 그람음성세균 특이성이 있다. 그람음성세균간에 염기가 다른 부분은 동일 염기배치에 두 개의 염기를 도입하거나 inosine을 도입하였다.

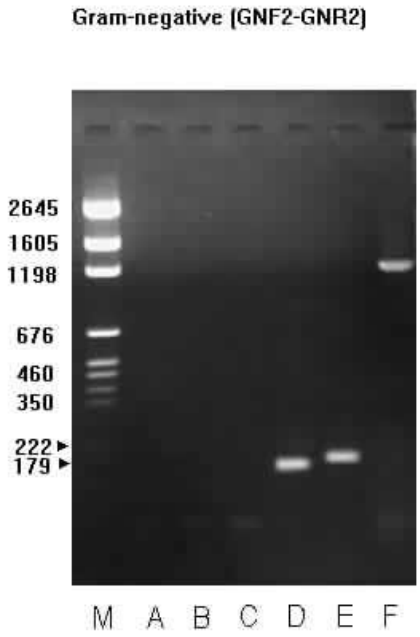
GNF1, GNF2 및 UNIV를 forward primer로서 GNR2를 reverse primer로서 사용하여 *Pseudomonas fluorescens*와 *Enterococcus faecalis*에서 각각 순수분리한 DNA를 template DNA로 하여 PCR방법에 의해 증폭하였다(Fig. 1). *P. fluorescens*에서는 모든 PCR에서 증폭된 DNA가 검출 되었다. GNF1과 GNR2를 사용한 PCR에서는 1,150bp의 DNA가 증폭되었으며 GNF2와 GNR2를 사용한 PCR에서는 180bp의 DNA가 증폭되었으며 UNIV와 GNR2를 사용한 PCR에서는 170bp의 DNA가 증폭되었다. 반면에 *E. faecalis*에서는 증폭되지않았다. 따라서 이 primer들을 사용한 PCR 방법이 그람음성세균을 특이적으로 검출함을 알 수 있었다.

Table 2. Gram-negative bacteria-specific nucleotide sequences of primer oligonucleotides based on 16S rDNA

Primer	Nucleotide sequence of 16S rDNA	
GNF1 (foward)	41	GGCAGI CC/ TTAACACATGCAA 60
GNF2 (forward)	1024	ACGTGCTGCATGGCTGTCG 1032
UNI V (forward)	1029	GTCGTCAGCTCGTGTCGTG 1047
GNR2 (reverse)	1203	GTAAGGGCCA/ GTGATGACTAG 1194

* Gram-negative bacteria : *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter johnsonii*, *Aeromonas* sp. *Flavobacterium breve*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp.

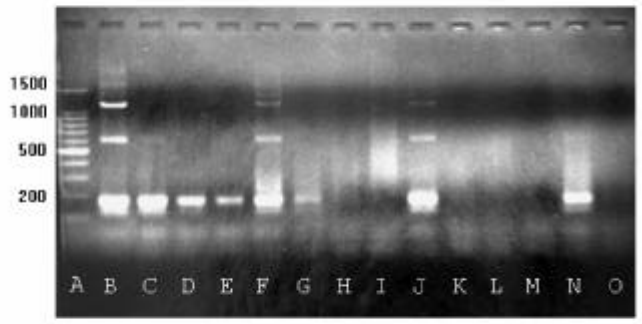
* Gram-positive bacteria : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*,



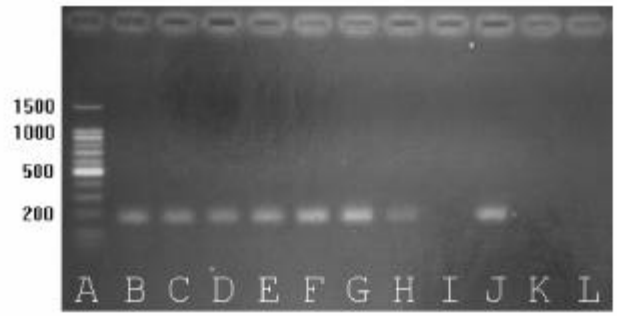
*P. fluorescens*의 배양액을 PBS용액으로 희석한 후에 boiling 방법, lysis 방법 및 bead beater 방법을 이용하여 DNA 추출물을 제조하여 PCR에 사용하였다. 각 PCR 반응액에 2×10^{6}CFU, 2×10^{4}CFU, 2×10^{2}CFU 및 2CFU의 세균에 해당하는 DNA 추출액을 첨가하였으며 primer로서 GNF1과 GNR2를 사용하였다. 10^{6}의 세균수에서 boiling 방법에서 가장 강하게 DNA

를 template로 하고 GNF2와 GNR2 primer를 사용하여 semi-nested PCR 반응을 수행하였다(Fig. 3). 이 반응에서 boiling 방법에서 2×10^{6}CFU부터 2CFU의 세균까지 DNA가 모두 합성되었으며 bead beater 방법에서 2×10^{6}CFU와 2×10^{4}CFU에서 DNA가 합성되었다. 2×10^{6}CFU의 세균이 첨가된 경우에는 1200bp와 600bp의 DNA가 또한 합성되었다.

초고온순산살균유 2제품과 저온장시간살유 2제품을 원심분리하여 세척하고 semi-nested PCR로 증폭한 결과 4 제품 모두 16S rDNA가 합성되었다(Fig. 4). 저온장시간살균유에 *P. fluorescens*를 첨가하고 65℃, 80℃ 및 100℃에서 30분간 열처리한 시유에서 DNA가 합성되었다. 121℃에서 15분간 autoclave한 시유에서는 DNA가 합성되지 않았다.



ed 16S
beater
method and lysis buffer method. A, 100bp ladder; B, C, D and E,



min; I, heated at 100 C for 30 min; J, autoclaved at 121 C for 15min; J, not heated; K, water(control) in semi nested PCR; L, water(control) in 2nd PCR.

우유 1㎖에 *P. fluorescens*를 가하고 65℃에서 30분간 살균한 다음에 원심분리하여 PBS로 세척하고 TE buffer에 분산된 세균체를 0.1U, 1U 와 5U의 DNase를 첨가하고 37℃에서 30분간 반응한 다음에 95℃에서 15분간 가열한 다음에 semi-nested PCR로 16S rDNA를 증폭하였다(Fig. 5). 우유, 10^6CFU의 *P. fluorescens*가 첨가된 우유 및 65℃에서 가열처리된 우유 모두 DNA가 증폭하여 우유 시료에 그람음성세균 DNA가 존재하며 또한 65℃ 30분의 열처리에 의하여 DNA가 파괴되지 않음을 알 수 있었다. 가열처리 후 DNase를 첨가하여 반응시킬때에 0.1U의 DNase에서는 DNA가 증폭되나 1U와 5U의 DNase에서는 DNA가 증폭하지 않았다. 가열처리되지 않은 경우 0.1U와 1U에서는 DNA가 합성되었으나 5U에서는 합성되지 않았다.

이상의 결과에서 65℃에서 30분간 살균된 우유에 있는 *P. fluorescens*의 DNA는 살균되지 않은 우유의 *P. fluorescens*에 비해 DNase에 의해 민감하게 분해하였다. 또한 열처리에 의해 *P. fluorescens*의 DNA가 파괴가

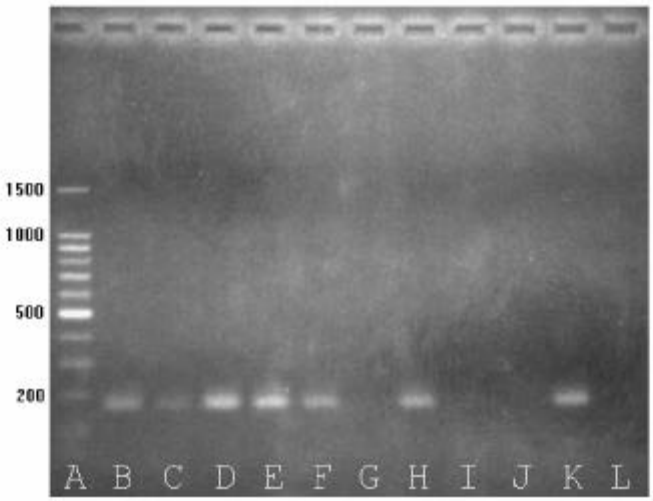
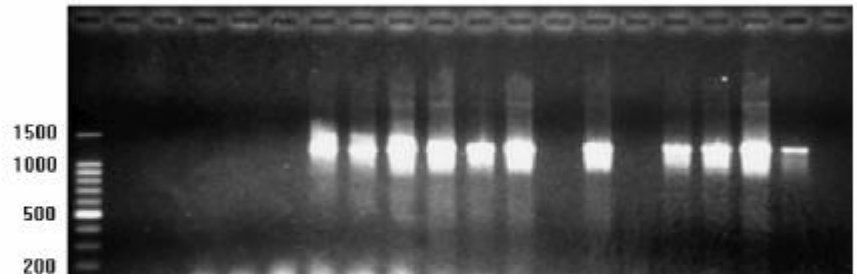
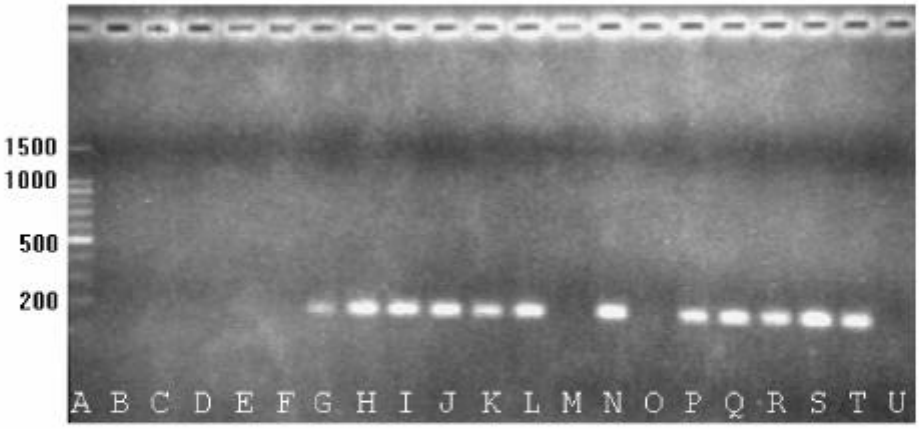


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of semi-nested PCR-amplified 16S rDNA of *P. fluorescens* heated at 60℃ for 30min and treated with DNAse. A, 100bp ladder; B, milk; C J, milk added with *P. fluorescnes*; C, D, H, I and J, heated at 65℃ for 30min; D, treated without DNase at 37℃ for 1hr; E and H, treated with 0.1U DNase; F and I, treated with 1U DNAse; G and J, treated with 5U DNase; K, purified DNA, L, water(control).


1500
1000
500
200


1500
1000
500
200
A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U

GNF1 primer와 GNR2 primer 그리고 GNF2 primer와 GNR2 primer을 사용한 PCR(Fig. 6)에 의해 100℃에서 열처리한 그람양성세균과 그람음성세균들의 추출물로부터 16S rDNA의 증폭 여부를 조사하였다. 그람양성세균들은 DNA가 증폭이 되지 않았다. 그람음성세균들중에서 *Achromobacter lyticus*와 *Alcaligenes faecalis*에서부터 DNA가 합성되지 않았으며 *Pseudomonas*와 *Acinetobacter baumaii*, *Enterobacter aerognes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichi coli*에서부터 DNA가 합성되었다.

IV. 적 요

그람음성세균 특이성 primer을 semi nested PCR에 사용하여 그람음성세균을 2CFU 까지 검출할 수 있는 분자유전학적 방법을 개발하였다. GNF1과 GNR2, GNF2와 GNR2 및 UNIV와 GNR2의 primer 쌍을 사용한 PCR은 *Enterococcus faecalis*의 DNA로부터 16S rDNA를 합성하지 않았으며 *Pseudomonas fluorescens*의 DNA로부터 16S rDNA를 합성하였다. Boiling 법을 사용하여 2CFU의 *P. fluorescens*의 DNA 추출물로부터 DNA가 합성되었다. 초고온순간살균유와 저온장시간살균유로부터 PCR에 의해 16S rDNA가 합성되었다. 저온장시간살균유에 *P. fluorescens*로 첨가한 후에 65℃, 80℃ 100℃에서 30분간 가열한 시료에서 16S rRNA가 합성되었다. 그러나 121℃에서 15분간 autoclave한 시료에는 합성되지 않았다. *P. fluorescens*를 첨가한 시유를 65℃에서 30분간 살균한 후 DNase 처리하였을 때에 16S rDNA가 합성되지 않았다. *Achromobacter lyticus*와 *Alcaligens faecalis*를 제외한 그람음성세균에서는 16s rDNA는 합성되었고 그람양성세균에서는 합성되지 않았다.

제 7 절 인용문헌

1. Atlas, R. M. and L. C. Parks. 1993. Handbook of microbiological media. CRC Press, Boca Raton.
2. Barnard, S.E. 1995. Extending the keeping quality of fluid milk to 21 days. Dairy, Food and Environ. Sanit. 15:12-16.
3. Baustista, D. A., L. McIntyre, L. Laleye, and M. W. Griffiths. 1992. The application of ATP bioluminescence for the assessment of milk quality and factory hygiene. J. Rapid Methods Automat. Microbiol., 1:179-193.
4. Bej, A.K., M.H. Mahbubani, and R.M. Atlas. 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. Appl. Environ. Microbiol. 57:597-600.
5. Bishop, J.R., and C.H. White. 1986. Assessment of dairy product quality and potential shelf life - a review. J. Food Prot., 49:739-753.
6. Bishop, J.R., C.H. White, and R. Firstenberg-Eden. 1984. Rapid impedimetric method for determining the potential shelf-life of pasteuried whole milk. J. Food Prot., 47:471-475.
7. Bishop, J.R., and C.H. White. 1985. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. J. Food Prot., 48:663-667.
8. Bodyfelt, F.W, J. Tobias, and G.M. Trout. 1988. The sensory evaluation of dairy products. Van Bostrand Reinhold.o
9. Bossuyt, R. 1982. A 5-minute ATP platform test for judging the bacteriological quality of raw milk. Neth. Milk Dairy J., 36:355-364.
10. Bossuyt, R. G. and G. M. Wales. 1983. Impedance measurements to detect post-pasteurization contamination of pasteurized milk. J. Food Protect,. 46:622-624.
11. Byrne, Jr, R.D., J.R. Bishop, and J.W. Boling. 1989a. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing a selective preliminary incubation. J. Food Prot., 52:805-807.
12. Byrne, R.D., J.R. Bishop, and M.L. McGilliard. 1989b. Selective preliminary incubation for gram-negative psychrotrophic bacteria in milk. J. Food Proct., 52:805-807.

13. Cooray, K.J., T. Nishibori, H. Xiong, T. Matsuyama, M. Fujita, and M. Mitsuyama. 1994. Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogens* by PCR in artificially contaminated milk samples. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3023-3026.
14. Giovannoi, S.-J., E.F. DeLong, G.J. Olsen, and N.R. Pace. 1988. Phylogenetic group-specific oligonucleotide probe for identification of single microbial cells. J. Bacteriol. 170: 720-726.
15. Greisen, K., M. Loeffelholz, A. Purohit, and D. Leong. 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 32: 335-351.
16. Griffiths, M. W 1993. Applications of bioluminescence in the dairy industry. J. Dairy Sci., 76: 3118-3125.
17. Gyllenberg, H., E. Eklund, M. Antila, and U. Vartiovaara. 1960. Contamination and deterioration of market milk. II. Significance of pseudomonads as deterioration bacteria. Act Agric. Scand., 10: 50-64.
18. Hashimoto, Y., Y. Itho, Y. Fujinaga, A.Q. Khan, F. Sultana, M. Miyake, K. Hirose, H. Yamamoto, and T. Ezaki. 1995. Development of nested PCR based on the ViaB sequence to detect *Salmonella typhi*. J. Clin. Microbiol., 33: 775-777.
19. Hendrickson, D. A. and M. M. Krenz. 1991. Reagents and stains, p. 1289-1314. In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed.) Manual of clinical microbiology, 5th ed,. American Society of Microbiology, Washington D.C..
20. Herman, L.M.F., J.H.G.E. De Block, and R.J.B. Moermans. 1995. Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a two-step PCR with nested primers. Appl. Environ. Microbiol. 61: 817-819.
21. IDF. 1993. Catalogue of tests for the detection of post-pasteurization contamination of milk. Bulletin of the IDF 281, pp13-34.
22. Kessler, H.G. 1981. Food engineering and dairy technology. published by V. A. Kessler. Freising, F. R. Germany.

23. Kuramoto, S., R. Jenness, S.T. Coulter, and R.P. Choi. 1959. Standardization of the Harland-Ashworth test for whey protein nitrogen. J. Dairy Sci., 42:28-38.
24. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London) 227:680-685.
25. Langeveld, L. P. M, F. Cuperus, P van Breemen, and J. Dijkers. 1976. A rapid method for the detection for the detection of post-pasteurization contamination in HTST-pasteurized milk. Neth. Milk Dairy J. 30:157-173.
26. Lewis, M.J. 1986. Advances in the heat treatment of milk. in R.K. Robinson ed. Modern dairy technology Volume 1. Advances in milk processing. pp 1-50. Elsevier.
27. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein determination with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem, 193:265-275.
28. MacFaddin, J. F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd. ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
29. Marshall, R.T. (1193) Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association.
30. McMeekin, T.A. and T. Ross. 1996. Shelf life prediction: status and future possibilities. Inter. J. Food Microbiol. 33:65-83.
31. Mead, G. C. 1985. Enumeration of pseudomonads using cephaloridine-fucidine-cetrimide agar (CFC). Inter. J. Food Microbiol., 2:21-26.
32. Phillips, J. D. and M. W Griffiths. 1985. Bioluminescence and impedimetric methods for assessing shelf-life of pasteurized milk and cream. Food Microbiol. 2:39-51.
33. Phillips, J. D. and M. W Griffiths. 1989. Pasteurized dairy products-the constraints imposed by environmental bacterial contamination. *in* J. O. Nriagu and M.S. Simmons, ed. Advances in Environmental Science and Technology: Food Contamination from Environmental Sources. p. 387. John Willey and Sons, New York.
34. Phillips, J. D., M. W Griffiths, and D. D. Muir. 1981. Growth and associated enzymic activity of spoilage bacteria in pasteurized double cream. J. Soc. Dairy Technol., 36:41-43.
35. Phillips, J. D., M. W Griffiths, and D. D. Muir. 1984.

Preincubation test to rapidly identify post-pasteurization contamination in milk and single cream. J. Food Protect. 47: 391-393.

36. Rasmussen, H.N., O.F. Rasmussen, H. Christensen, and J.E. Olsen. 1995. Detection of *Yersinia enterocolitica* 0:3 in faecal samples and tonsil swabs from pigs using IMS and PCR. J. Appl. Bacteriol. 78: 563-568.
37. Reybroeck, W. and E. Schram. 1995. Improved filtration method to assess bacteriological quality of raw milk based on bioluminescence of adenosine triphosphate. Neth. Milk Dairy J., 49: 1-14.
38. Schaeffer, A. B., and M. Fulton. 1933. A simplified method of staining endospores. Science, 77: 194.
39. Varnam, A.H., and J.P. Sutherland. 1994. Milk and milk products - technology, chemistry and microbiology. Chapman and Hall. London.
40. Vasavada, P. C. 1993. Rapid methods and automation in dairy microbiology. J. Dairy Sci., 76: 3101-3113.
43. Visser, I. J. R. and J. M. F. H. de Groote. 1984. The Malthus microbiological growth analyzer as an aid in the detection of post-pasteurization contamination of pasteurized milk. Neth. Milk Dairy J., 38: 151-156.
44. Wales, G.M., and R.G. Bossuyt. 1982. Usefulness of the benzalkon-crystal violet-ATP method for predicting the keeping quality of pasteurized milk. J. Food Prot., 45: 928-931.
45. Wales, G. M. and R. G. Bossuyt. 1981. A rapid method to detect postcontamination in pasteurized milk. Milchwissenschaft, 36: 548-552.
46. Wales, G. M. and R. G. Bossuyt. 1982. Usefulness of the Benzalkon-crystal violet-ATP method for predicting the keeping quality of pasteurized milk. J. Food Protect., 45: 928-931.
47. White, C. H. 1993. Rapid methods for estimation and prediction of shelf-life of milk and dairy products. J. Dairy Sci., 76: 3126-3132.
48. White, C. H., J. R. Bishop, and D. M. Morgan. 1993. Microbiological methods for dairy products. In R.T. Marshall, ed. Standard methods for the examination of dairy products. pp.

287-308. American Public Health Association.
49. Wiedmann, M., J. Czajka, F. Barany, and C.A. Batt. 1992. Discrimination of *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species by ligase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3443-3447.
50. Wiedmann, M., F. Barany, and C.A. Batt. 1993. Detection of *Listeria monocytogenes* with a nonisotopic polymerase chain reaction-coupled ligase chain reaction assay. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2743-2745.
51. Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.
52. Uyttendaele, M., R. Schukkink, B. van Gemen, and J. Debevere. 1995.
53. **강일수, 이진희, 이수원**. 1995. **국내 살균유의 품질비교에 관한 연구. 한낙지**, 17: 161-166.
54. **김광수, 최석호**. 1993. **액상유제품의 아미노산, 지방산, 당, 미생물수에 관한 연구. 한낙지**, 15: 118-127.
55. **최석호, 인영민**. 1993. **살균유와 환원유의 단백환원물질과 가용성 유청단백질에 관한 비교 연구. 한낙지**, 15: 290-297.
56. **최석호, 이승배**. 1994. **면역측정법과** acid ferricyanide **환원물질 측정법을 이용한 우유의 가열조건 추정방법 개발에 관한 연구. 한축지**, 36: 661-669.
57. **한국식품공업협회**. 1994. 4. **유가공품**, 4-1 **우유류. 식품공전** pp 149-153.

제 3 장 *Staphylococcus aureus*와 Streptococci의 원유오염경로에 관한 연구

제 1 절 *Staphylococcus aureus*와 Streptococci의 우유생산 환경 중에서 분리동정 및 분포상태 조사

SUMMARY

Specimens were taken from milk, body surfaces of dairy cow and environments of ten selected dairy farms located in Kyunggido, Korea. Identification of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysagalactiae* by using IDF and molecularl biological methods from 572 samples taken during winter and summer season was conducted. Isolation rates of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* were 29.2 % and 3.2%, respectively and those of environmental mastitis pathogen *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysagalactiae* were 11.4% and 6.4%, respectively.

In order to identify at the species level, PCR performed with rRNA primers STAA-AuI, STRU-UbI and STRD-DyI from 16S-23S intergenic spacer region amplified specific DNA products for those species. Using specific primers, *Staphylococcus aureus* strains producing six types of enterotoxin A, B, C, D, E, and TSST-1 could be effectively differentiated.

1. 서론

유방염은 유우에서 유선에 병원성 미생물 감염에 결과 기인되는 질병으로서 우유의 생산효율을 감소시킴은 물론 낙농산업에 심대한 영향을 주는 주요 질병으로 인식되어 있어 이 질병의 조기 진단, 병원성, 역학적인 경로조사, 병원균의 동정방법, 병원균에 대한 면역학적 대처방법 및 치료방법 등에 관하여 광범위한 연구가 전 세계적으로 활발하게 진행되고 있다.

유방염 원인세균은 2개의 부류로 구분되는데 전염성(contagious pathogen)인 병원성 균과 환경에서 유래되는 환경형 병원균(environmental pathogen)이 있다. 전염성 병원균은 유우의 유선에서 생장과 증식이 가능한 것으로서 착유 과정에서 유우간에 확산 가능한 세균을 지칭한다. 그러나 환경형 병원균은 유우 축사의 환경 중에 살아있는 병원균을 지칭한다(Oliver와 Mitchell, 1983).

전염성 유방염 병원균으로 분류되는 것은 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* spp. 및 *Corynebacterium bovis* 등이 포함되나 환경형 유방염 병원균에 속하는 것은 매우 광범한 다양성을 보이며 *Streptococcus agalactiae*를 제외한 모든 streptococci 균종을 집합적으로 환경형의 streptococci로 지칭하며 대장균군이 포함된다(Kang 등 1990: Kang 등 1991: Jeffrey, 1988: Davis 등, 1996).

환경형 유방염 병원균 중 *Streptococcus* spp.에 포함되는 종은 *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. equinus(bovis)*, *S. equi*, *S. parauberis* 및 *S. canis* 등이 포함된다. 이들 중에서도 검출빈도 면으로 보아 중요한 균종은 *S. uberis*와 *S. dysagalactiae*인 것으로 확인된 바 있다(Batish와 Chander 1987).

Staphylococcus aureus 중에서 coagulase positive인 것이 주로 유방염 발생에 관여되고 있다. 20세기 초반에는 유방염의 원인균은 *Streptococcus agalactiae*인 것으로 추정했었으나 기계착유 방법이 보편화되면서 *Staphylococcus aureus*에 의한 유방염이 빈발하였다. 그러나 이 세균이외에도 수종의 streptococci가 분리되었는데 이는 병원성과는 관계되지 않는 단순한 오염세균으로 인정하고 있다.

본 연구에서는 우리 나라의 낙농목장의 중심지역으로 알려진 경기도 지역에 위치한 10개의 선정된 목장에서 우유 생산 환경 전체를 망라한 대상으로부터 시료를 채취하여 유방염 원인균이 되는 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus* spp.를 분리하여 동정하고 신속 간편한 동정을 위하여 분자생물학적 방법적용의 가능성을 검토하고 이들의 분포상황을 분석하고 감염원과 감염경로를 추적하기 위한 자료를 얻기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료 채취방법

1) 우유 : 착유시에 멸균된 cap tube안에 적당량을 취한다.

2) 개체 시료 : 멸균된 면봉을 이용하여 2 ×4㎝를 swab한 후 swab된 면봉을 Brain heart infusion broth (BHI broth)가 3㎖ 담겨진 tube에 넣는다.

3) 직장, 질, 유두공은 면봉을 전 ·후 3-4회 회전하여 sample을 채취하였고 muzzle 시료는 콧잔등 주위의 타액이 묻도록 swab 한다.

4) 환경 시료의 채취

가) Bedding ; 소의 운동장 바닥에 있는 깔짚 또는 톱밥을 10 g정도 취한다. 1 g을 10㎖ BHI broth에 넣는다.

나) Feed stuff ; Bedding 시료와 같다.

다) Equipment ; 주로 착유기 내 ·외를 멸균된 면봉을 이용하여 swab 한다.

라) Housing ; 소의 운동장, 담, 울타리 등을 swab 한다.

마) Non bovine animal ; 주로 목장의 dog 위주로 muzzle 주위를 swab 한다.

바) Handler ; 착유시 착유자의 손등 및 콧잔등을 swab 한다.

사) Air ; 착유실 대기의 오염정도를 측정하려 한다.

Baird-Parker plate와 Blood plate를 약 1시간 정도 open 시켜 둔다.

나. 분리된 균주의 *Staphylococcus aureus*의 동정방법

1) Sample은 milk sample을 제외하고는 BHI broth에 배양한다(37℃ 4시간). Air sample은 37℃ 24시간정도 배양한다.

2) Baird Parker plate에서 흑색 colony를 나타내고, coagulase test에 양성인 것을 staphylococci로 간주하고 blood plate에서는 hemolysis type를 판정한다.

3) Coagulase test

Difco rabbit plasma를 이용하여 응고 현상을 판정한다. Positive 등급을 4단계로 구분한다.

다. *Streptococcus* spp.의 동정방법

1) Rapid hippurate hydrolysis test에 의하여 동정한다.

2) Heavy suspension colony(culture)를 준비한 후 0.5㎖ solution hippurate에 접종하고 2시간 후에 0.2㎖의 ninhydrin을 첨가하고 잘 섞는

다. 0.2㎖의 ninhydrin을 첨가하여 10분 이내에 탈색이 일어나면 양성으로 판정한다.

3) Carbohydrate utility test

Phenol red broth, pH 7.4에 맞춘다. 당용액(stock)을 최종농도 1-2% 되게 첨가한다. 각 sample중 당이 첨가되지 않은 phenol red plate를 control로 한다. Positive reaction은 노란 색이나 오렌지색으로 탈색이 이루어지는 것을 기준으로 하며, culture 접종 후 4-6시간 37℃에서 배양한 후에 판정한다.

라. API Strep 동정 kit에 의한 확인

Kit 사용 지시사항에 따라 *Streptococcus*의 종으로 분리 동정된 결과를 이 방법에 따라서 재확인한다.

마. 16S-23S spacer ribosomal DNA primer를 활용한 *Staphylococcus aureus* 및 *Streptococcus* spp.의 동정방법

배양된 culture를 원심분리(16,000 rpm)한 후 1ml washing buffer에 현탁하고, 원심분리하여 상층액은 제거한 후 300㎕ washing buffer에 현탁한다. 20㎕ lysostaphin과 10㎕ RNase를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨다. 다시 20㎕ proteinase K와 50㎕ SDS(10%)를 첨가하고 50℃에서 1시간 반응시킨다. 600㎕ phenol-chloroform-isoamylalcohol(25:24:1)가하여 잘 혼합하고, 원심 분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮기고 550㎕ chloroform-isoamylalcohol (24:1)을 가한 후 원심분리 한다. 상층액을 새로운 tube에 옮긴 후 16㎕ 5M NaCl, 100% Ethanol 800㎕를 가한 후 현탁시킨다. -20℃에서 1시간 방치한 후 원심분리하고, 상층액을 제거한 뒤에 70% ethanol로 세척한다. ethanol을 제거(air dry)하고, 200㎕ TE buffer에 DNA를 녹인다. 10㎕의 DNA를 PCR용 kit(Bioneer, Korea)에 넣고 증류수 10㎕를 가한다. 1차 products를 2차 kit에 넣고 PCR을 수행한다. 최종 DNA products를 2% agarose gel을 만들어 전기영동을 한다.

3. 결과

가. 시료채취 결과

본 실험을 효율적으로 추진하기 위하여 목장의 선정은 대형의 모범적인 위생관리가 이루어지는 성원목장과 매우 영세한 규모의 소규모목장 1개 목장을 선정하였으며, 우리 나라 낙농목장의 평균 크기에 해당하는 중

간형목장 7개를 시료채취 대상 목장으로 선정하여 시료를 채취하였다.

시료는 대별하여 우유 시료, 체표면 시료 및 환경 시료 3군으로 구분하여 채취되었고, 각 목장별 시료채취 내역은 Table 1에서는 동절기 시료채취 결과, Table 2 에서는 하절기 시료채취 결과를 각각 제시하였다.

Table 1. 대상 목장별 *Staphylococcus aureus* 및 streptococci 분리용 시료 채취내역(동절기)

목 장 명 (기호)	Milk sample	체 표 면					환 경
		Muzzle	Side	Rectum	Vagina	Orifice	
중대(CA)	15	7	3	7	3	3	8
펠렉스(PLX)	6	4	2	4	3	2	9
웅 수(ws)	6	6	5	6	5	5	9
주 림(JL)	3	5	4	5	4	4	9
영오(YO)	6	4	2	5	3	2	9
성원(SW)	5	7	2	6	2	2	9
건천(GC)	5	4	2	4	3	2	9
오현경(OHK)	5	2	1	2	1	1	9
초야(CY)	6	3	2	3	2	2	9
계	57	42	23	42	26	23	80
		156					

Table 2. 대상 목장별 *Staphylococcus aureus* 및 streptococci 분리용 시료채취 내역(하절기)

목장명(기호)	Milk sample	체 표 면					환 경
		Muzzle	Side	Rectum	Vagina	Orifice	
중 대(CA)	16	2			4		8
펠렉스(PLX)	10	2	1	2	2	1	9
웅 수(WS)	8	2	1	2	2	1	9
세공주(SGJ)	16	3	2	3	3	2	9
영 오(YO)	12	3	1	3	1	2	9
성 원(SW)	16	2	1	2	2	1	8
건 천(GC)	10	2	1	2	3	1	9
오현경(OHK)	17	3	2	2	2	2	9
초 야(CY)	9	3	2	3	3	2	9
계	114	22	11	19	22	12	79
		86					

1차 시료채취는 1996년 12월 실시되었고, 우유 시료 57점, 체표면 시

료 156점, 환경 시료 80점, 총 293점이 채취되었고, 2차 시료채취는 1997년 6월 실시 되었으며, Table 2에 제시된 바와 같이 우유 시료 114점, 체표면 시료 86점, 환경 시료 79점이 각각 채취되어 총 279점이 채취되었으며, 채취된 총 시료 수는 572점 이였다. 이를 냉동상태에서 보존하면서 미생물 분리 동정 및 기타의 실험에 사용하였다.

나. 분리균주의 동정 결과

1) *Staphylococcus aureus*, *Str. uberis*, *Str. agalactiae* 및 *Str. dysagalactiae*의 동정

IDF가 제시한 표준 방법에 따라 우유 중에 포함된 *Staphylococcus aureus*를 동정하기 위한 절차를 이용하여 동정하였다. Baird-Parker plate에서 특징적인 균락을 형성한 것을 분리한 후 hemolysis를 일으키며, catalase 양성인 것이 확인되면 *Staphylococcus aureus*로 동정하였다.

Str. uberis, *Str. agalactiae* 및 *Str. dysagalactiae*의 동정실험을 위하여 Brain heart infusion broth에 배양한 후 Table 3에 제시된 생화학시험 기준에 따라 동정하고, 이 중에서 알파용혈을 일으키는 균주를 선별한 후, 다시 API 당발효 kit를 사용하여 균종수준까지 동정확인실험을 실시하였고, 분리균주별 번호와 각 균종별 분리균주번호(isolates)별 분리원은 Table 4에 제시되었다.

Table 3. *Streptococcus* spp.의 동정시 주요 생화학적 시험결과 기준

Bacteria	Biochemical reaction			
	Hippurate hydrolysis	sorbitol	ribose	trehalose
S. agalactiae	+	-	+	+
S. dysagalactiae	-	+	+	+
S. uberis	+	+	+	+
S. iniae	-	-	+	+
S. adjacens	-	-	-	-

Table 4에 제시된 바와 같이 *Staphylococcus aureus* 분리균주 46 균주, *Staphylococcus aureus* 표준균주 11 균주, *Str. agalactiae* 분리균주 7 균주, *Str. uberis* 분리균주 20 균주, *Str. dysagalactiae* 분리균주 21 균주 및 표준균주 3 균주를 확보하여 보존균주로 확보하였다.

Table 4. 목장별 분리균주의 균종동정 결과 및 균종별 분리균주 번호와 분리원

Isolate Designation	Sources	Farm*
Staphylococcus aureus		
CJU 1101, 1104, 1176	Floor of barn	CA, SW, YO
1106, 1120, 1157	Feedstuff	CA, US, CY
1105, 1158, 1133	Wall of Barn	CA, CY, SGJ
1149	Air of Barn	SW
1159, 1134	Milking machine	CY, SGJ
1104, 1135, 1189, 1182,	Dog of farm	CA, SGJ, GC
1110		CHK, PLX
1103, 1108, 1115,	Vagina of cow	CA, CA, WS$_1$,
1117, 1166, 1183		WS$_2$, CY, GC
1147, 1165, 1142, 1192	Rectum of cow	SW, CY, SGJ, GC
1154, 1171, 1172,	Teat of cow	SW, YO, YO,
1173, 1143		YO, SGJ
1107, 1164	Muzzle of cow	CA, WS
1122, 1146, 1162 , 1163	Raw Milk	WS SW, CY$_1$, CY$_2$,
1124, 1174, 1136 1137,		JL, YO, SGJ$_1$, SGJ$_2$,
1138, 1139, 1113, 1114		SGJ$_3$ SGJ$_4$ PLX, PLX
ATCC13515, FRI 913, MNHCCH, MNDCN, PMIN403, FRI472, FRI 326 805T, 807C, 877A-S, FRIMN8, RN4220	Reference strain	Seoul National Univ.
Streptococcus agalactiae		
CJU 2132	Air of Barn	YO
2129	Water	CY
2102	Milk (mastitis)	CA
2119, 2114, 2117, 2104	Raw Milk	YO, CY, CY, JL
ATCC 13813	Reference	Seoul National Univ.
Streptococcus uberis		
CJU 2123,	Feedstuff	CA
2124, 2131, 2135,	Milking machine	CA, YO, CHK,
2133	Hand of handler	YO
2137, 2146, 2145	Vagina of cow	CA, YO, CY,
2140, 2149, 2143	Rectum	CA, YO, CY

	2136, 2148,	Teat	CA, YO
	2142, 2144	Muzzle	CY1, CY2
	2111, 2116, 2122	Raw milk	SW, CY, GC
	2121 2110		CHK, WS
ATCC 27957		Reference strain	Seoul National Univ.
Streptococcus dysagalactiae			
CU	2127, 2130	Floor of barn	PLX, YO
	2128	Hand of handler	GC
	2134	Water of barn	CHK
	2138, 2147, 2150	Muzzle of cow	CA, YO, GC
	2139,	Skin	CA
	2101, 2105, 2106	Raw milk	CA1, CA2, CA3
	2107, 2103 2108,		CA4, PLX1, PLX2
	2109 2112, 2113,		PLX3, SW, SW
	2118, 2120, 2141, 2115		YO, YO, JL, CY
ATCC 27957		Reference strain	Seoul National Univ.

* CA; Chungang, WS; Woongsoo, SW; Sungwon, CY; Choya, JL; Joolim, YO; Yungoh, SGJ; Segongju, GC; Gunchun, CHG; Chyungyung, PLX; Pelix.

2) 유방염 원인균의 분자생물학적 동정 결과

Fig. 1은 *Staphylococcus aureus* 표준균주를 16S-23S intergenic spacer ribosomal DNA oligonucleotide primer를 사용하여 PCR에 의해 증폭한 후 전기영동하여 표준 균주로부터 얻은 band와 size marker가 제시되었다. 분리 균주가 증폭된 특정 band를 나타내고 있어 이 균주는 *Staphylococcus aureus* 균주로 판명되며, 비교적 그 결과를 빠른 시간 내에 얻을 수 있어 진단과 적절한 치료를 위하여 유용하게 활용 가능한 것으로 보인다.

Fig. 2에는 *Streptococcus* spp.의 균종분리를 위하여 16S-23S intergenic spacer primer를 이용하여 PCR에 의하여 균종을 확인한 결과이다. *Str. agalactiae*, *Str. uberis* 및 Str. *dysagalactiae*의 DNA product size는 270bp, 320bp 및 960bp(880bp)로 나타났다.

Table 5. *Staphylococcus aureus* 와 streptococci 균속 및 균종동정에 PCR에 사용된 primer 와 product의 크기(16S-23S intergenic spacer rRNA)

Genus/species	Oligonucleotide	Sequence(5'>3')	Length (nt)	$MgCl_2$ in PCR (mM)	Size of the main PCR product (bp)
Streptococcus-genus	STR I	TGTTTAGTTTTGAGAGGTCTTG	22	1.5	150-210
	STR II	CGTGGAATTTGATATAGATATTC	23		
Staphylococcus-genus	STA I	GGAATAACGTGACATATTGTA	21	2.0	100-200
	STA II	TTCACTCGGTTTTGCTTGG	19		
Str. dysagalactiae	STRD-DyI	TGGAACACGTTAGGGTCG	18	1.5	370
	STRD-23-1D	CTTACAGCTCCCCAAAGCAT	20		
Str. uberis	STRU-UbI	TAAGGAACACGTTGGTTAAG	20	3.5	330
	STRU-UbII				
Sta. aureus		TCCAGTCCTTAGACCTTCT	19	2.0	420
	STAA-AuI	TCTTCAGAAGATGCGGAATA	20		
	STAA-AuII	TAAGTCAAACGTTAACATACG	21		

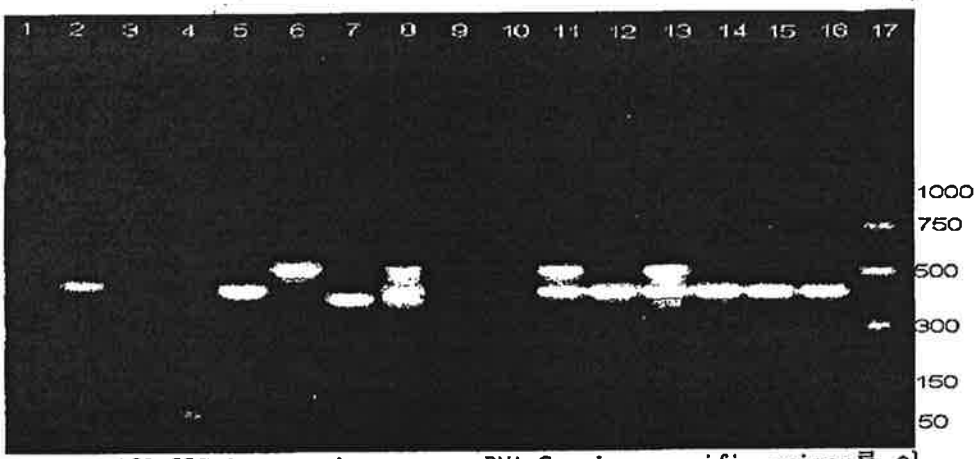


Fig. 1. 16S-23S intergenic spacer rRNA Species specific primer를 이용한 reference strains의 PCR 결과

Lane 1: *Staphylococcus epidermidis* CU, lane 2: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, lane 3: *Staphylococcus hyicus* NVRI, lane 4: *Staphylococcus aureus* NCTC 9393, lane 5: *Staphylococcus aureus* FRI 913, lane 6: *Staphylococcus aureus* ATCC 13515, lane 7: *Staphylococcus aureus* MNHOCH, lane 8: *Staphylococcus aureus* MNDON, lane 9: *Staphylococcus aureus* FRI 472, lane 10: *Staphylococcus aureus* FRI 326, lane 11: *Staphylococcus aureus* RN4220 pMIN403, lane 12: *Staphylococcus aureus* FRI MN8, lane 13: *Staphylococcus aureus* RN4220, lane 14: *Staphylococcus aureus* 805(T), lane 15: *Staphylococcus aureus* 807(C), lane 16: *Staphylococcus aureus* 877(A-S), lane 17: size marker

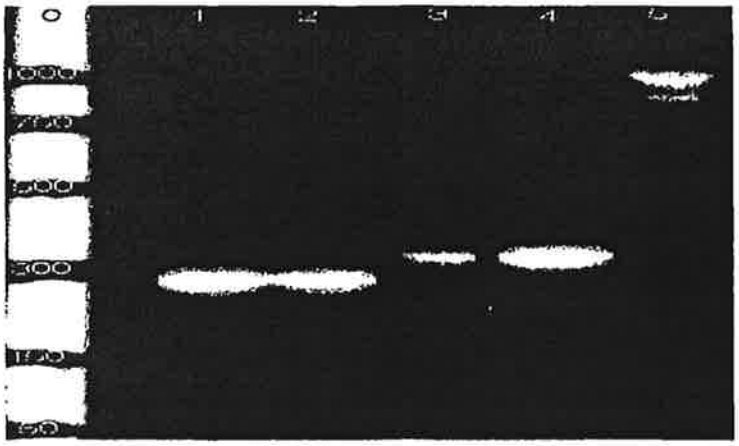


Fig. 2 Streptococci의 species 수준의 동정

Species	products size
Lane 1, 2 : *Streptococcus agalactiae*	270bp
Lane 3, 4 : *Streptococcus uberis*	320bp
Lane 5 : *Streptococcus dysagalactiae*	960bp, 880bp

3) *Staphylococcus aureus*의 enterotoxin 생산 strain 구분

Table 3에 제시된 16S-23S rRNA intergenic spacer region primer인 AU I와 AU II를 사용하여 분리균주에 대한 종(species)동정을 72개 시료에 대하여 실시한 결과 amplified된 종에 대한 확인이 가능하였다. 그리고 증폭된 band size로서 toxin type을 추정할 수 있었다(Fig. 3). 총 16개의 *Staphylococcus aureus*의 reference strains을 이용하여 PCR 동정 실험하여 다음의 결과를 얻었다. 각 strains 또는 enterotoxin type에 따라서 증폭이 된 fragments의 크기가 다르게 나타났다. *Staphylococcus aureus* 균주 중에는 primer AU I와 AU II가 specific하게 증폭을 일으키지 않는 strain의 존재를 확인 할 수 있었다. Fig. 3의 Lane 8과 Lane 11에 나타난 enterotoxin C와 enterotoxin C-bovine의 toxin type의 경우와 같이 510bp 와 425bp에서 동시에 증폭이 이루어져 2개의 product를 생산하였다. toxin type에 따라서는 증폭이 전혀 이루어지지 않은 경우도 있었으며 이는 enterotoxin D와 enterotoxin E type의 경우이다.

종합적으로 고찰할 때 우선 genomic DNA상에서 항생제나 환경요인의 변화에 따른 genomic DNA sequence의 변화가 유발된 것으로 생각할 수 있다. 증폭된 size의 차이도 mutation에 따른 영향으로 생각할 수 있으며, amplified fragments가 2개로 나타나는 경우도 앞에 언급한 경우와 plasmid DNA의 유무에 따라서 가능하리라 생각된다. 그러므로 primer AU

I와 AU II를 이용한 PCR 균종동정 방법은 *Staphylococcus aureus*의 species의 동정에 이용될 수 있다는 결론을 얻게 되었다.

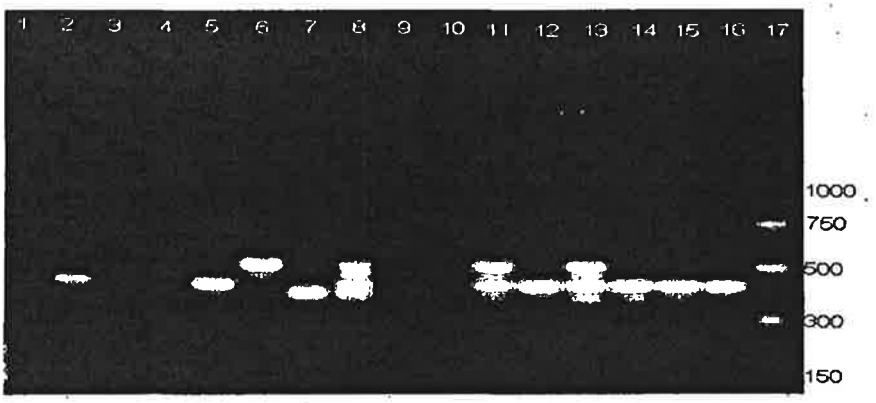
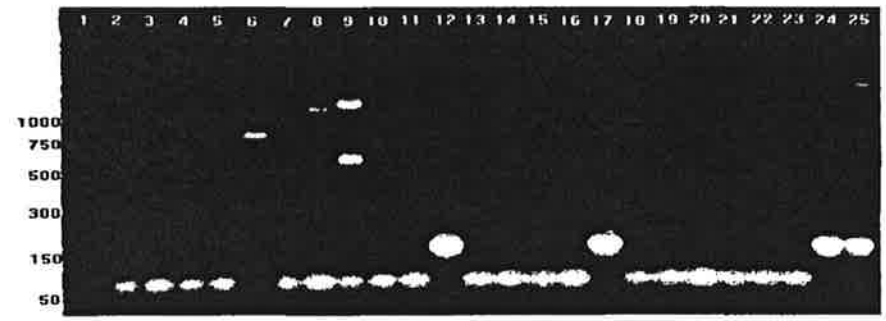


Fig. 3. *S. aureus* 의 reference strains에 따른 증폭된 band pattern

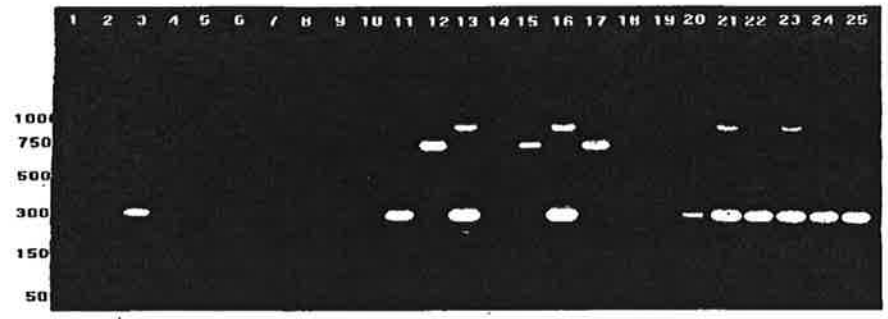
Lane	Strains	Product size(bp)	Lane	Strains	Products size(bp)
4	*S. aureus* NCTC 9393	510	5	*S. aureus* FRI 913	440
6	*S. aureus* Toxin A	520	7	*S. aureus* Toxin B	400
8	*S. aureus* Toxin C	518, 433	11	*S. aureus* RN4220	509, 426
12	*S. aureus* FRIMN8	429	13	*S. aureus* RN4220	500, 422
14	*S. aureus* 805(T)	415	15	*S. aureus* 807(C)	426
16	*S. aureus* 877(A-S)	426			

A

B

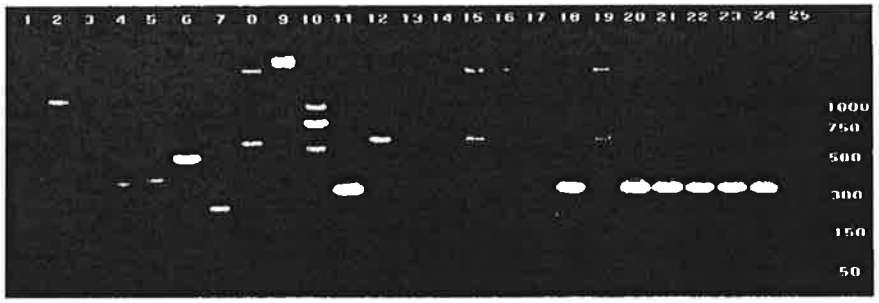


C

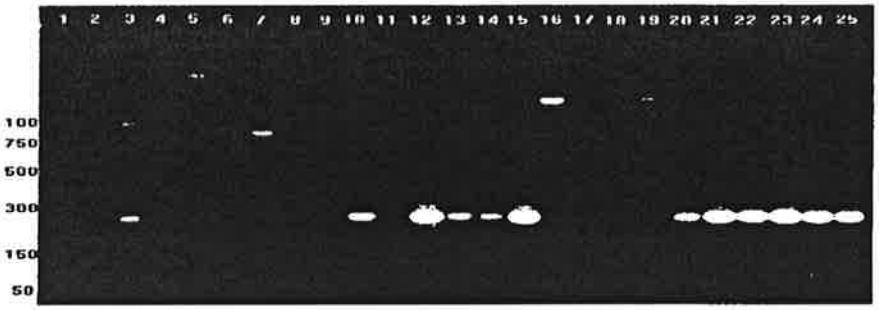


D

자료출처 : 고품질 우유의 생산 기술 개발 / 농림부



E



TSST-1

Fig. 4. 표준균주에서 Enterotoxin 생성과 PCR product

Lane 1: size marker, Lane 2: *Str. agalactiae* CU, lane 3: *treptococcus agalactiae* ATCC 13813, lane 4: *Str. uberis* CU, lane 5: *Str. uberis* ATCC 27958, lane 6: *Str. dysagalactiae* 27957, lane 7: *Str. pyogenes* CU, lane 8: *Staphylococcus epidermidis* CU, lane 9: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, lane 10: *Staphylococcus hyicus* NVRI, lane 11: *Staphylococcus aureus* NCTC 9393, lane 12: *Staphylococcus aureus* FRI 913, lane 13: *Staphylococcus aureus* ATCC 13515, lane 14: *Staphylococcus aureus* MNHOCH, lane 15: *Staphylococcus aureus* MNDON, lane 16: *Staphylococcus aureus* FRI 472, lane 17: *Staphylococcus aureus* FRI 326, lane 18: *Staphylococcus aureus* RN4220 pMIN403, lane 19: *Staphylococcus aureus* FRI MN8, lane 20: *Staphylococcus aureus* RN4220, lane 21: *Staphylococcus aureus* 805(T), lane 22: *Staphylococcus aureus* 807(C), lane 23: *Staphylococcus aureus* 877(A-S), lane 24, 25: *Staphylococcus aureus* ATCC 13515.

Fig. 4에는 *Staphylococcus aureus*에 있어서 생산하는 enterotoxin type 균주 동정하기 위하여 특이하게 사용되는 6종의 primer SEA, SEB, SEC, SED, SEE 및 TSST-1를 사용하여 enterotoxin A, B, C, D, E와 TSST-1 type의 PCR products는 120, 478, 257, 317, 170 및 350bp의 product가 확인되었고 이 결과는 Johnson 등(1991)과 일치한다.

다. 유방염 원인균 *Staph. aureus* 및 *Str.* spp.의 분리율

Table 6. Distribution of mastitis causing *Staph. aureus* and streptococci in raw milk and environmental samples

	Season of sampling		
	Summer 279	Winter 293	Total 572
Staphylococcus aureus(%)	57(20.4)	47(16.0)	104(18.2)
Streptococcus agalactiae(%)	9 (3.2)	10 (3.4)	19 (3.3)
Streptococcus dysagalactiae(%)	41(14.7)	17 (5.8)	58(10.1)
Streptococcus uberis(%)	26 (9.3)	19 (6.5)	45 (7.9)

시료 중에서 *Staphylococcus aureus*가 18%의 빈도로 존재함이 확인되었고, *Str. agalactiae*가 3.3%, *Str. dysagalactiae*가 10.1% 그리고 *Str. uberis*가 7.9%의 시료에서 확인되었다.

일반적으로 동절기에 채취된 시료보다 2종류의 유방염 원인균의 검출빈도는 현저하게 하절기에서 높게 나타났다. 또한 발생빈도를 볼 때 *Staphylococcus aureus*가 *Streptococcus* spp. 보다 높은 빈도로 출현되는 것으로 확인되었다. 또한 여름철에 착유된 우유 중에는 원유 내에 유방염 원인균이 배출될 가능성이 높다는 사실에 감안하여 원유를 그대로 저온살균 처리를 생략하고 음용하는 것은 지극히 위험하다는 사실을 제시하고 있다.

Table 7에서는 본 실험에서 채취된 목장별로 2종의 주요 유방염 원인균에 의한 감염상태에 대한 분석이 이루어 졌다. 동절기에 채취된 시료분석 결과 목장별로 차이를 크게 나타낼 수 있다는 구체적인 data로 그 중요성이 높을 것으로 평가된다.

특히 *Staphylococcus aureus*의 오염정도는 목장에 따른 격심한 정도의 차이를 보이고 있으며 원유의 착유 및 보관과정에서 바른 처리를 못함으로 서 나타나는 현상으로 판단된다.

Table 7. 목장별 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus* spp. 검출 현황

Herds	*Staphylococcus aureus* Positive		*Streptococcus* spp. Positive	
	Sample	%	Sample	%
CA	10	13.2	15	19.7
PLX	7	12.2	10	17.5
WS	12	17.9	5	7.4
JL	22	30.5	23	31.9
YO	10	16.1	15	24.2
SW	12	18.5	15	23.1
GC	10	17.5	15	26.3
OHK	9	15.5	9	15.5
CY	12	20.7	17	29.3

CA. 중앙 PLX. 펠렉스 WS. 웅수 JL 주림(세공주) YO영오 SW. 성원 GC 건천 OHK. 오현경 CY 초야

또한, 성원목장과 같은 원유 위생관리 상태가 우수한 대형 목장의 원유시료에서는 *Staphylococcus aureus* 및 *Streptococcus* spp. 두 종류의 병원균의 분리율이 4.8%와 14.3%인 반면 오현경 목장은 *Staphylococcus aureus*가 31.8%, 초야목장은 *Streptococcus* spp.이 26.7%로 현저한 차이로 분리율이 다르게 나타났다. 본 시험에서 *Streptococcus* spp.로 분리된 균주는 생화학적 시험과 형태학적 시험 등의 과정을 종합하여 Table 5에서 제시한 기준에 따라 5개 종으로 구분되었다.

분리된 시료의 형태학적인 특성과 gram 염색성 반응을 확인하였고 각 병원균별 특이한 형태적인 특성은 현미경 관찰에 의하여 결과를 확인하였다.

Table 6에서는 분리된 *Streptococcus*의 균종별로 분리빈도를 보여주고 있으며 *S. dysagalactiae*가 가장 높은 빈도로 출현되고 있는 것으로 확인되었고, 이러한 현상은 자료조사결과 나타난 환경형 streptococci에 의한 유방감염의 발생빈도와 유사한 성향을 보인 것이다.

라. 착유 환경의 *Staphylococcus aureus* 및 *Streptococcus* spp.의 오염상태

1) 계절별 유우 체표면의 *Staphylococcus aureus*의 오염도

Table 8에서는 동절기와 하절기를 대비하여 유우의 체표면 시료 중에

서 *Staphylococcus aureus*의 검출 빈도와 검출율을 표시하였다. 검출율은 일반적으로 하절기 시료에서 23.3%로 동절기의 13.4% 보다 높게 검출되었으며, 그 범위는 부위에 따라 차이를 나타내었으나 비경 부위에서 21.9%, 유방 side에서 8.8%, 직장 부위의 14.8%, 질에서 12.5% 및 유두공에서 25.7% 까지 높은 검출율을 나타내었다. *Staphylococcus aureus*의 검출율이 가장 높은 부위는 유두공으로서 동절기에는 26.1%이고 하절기에는 25%로 나타났다. 그러나 하절기에는 muzzle 부위가 40.9%로서 가장 높게 나타났다.

Table 8. *Staphylococcus aureus*의 체표면 오염 상태

Site	Winter			Summer		
	Total	No.	%	Total	No.	%
Muzzle	42	5	11.9	22	9	40.9
Side	23	3	13.0	11	0	0
Rectum	42	3	7.1	19	6	31.6
Vagina	26	4	15.4	22	2	9.1
Orifice	23	6	26.1	12	3	25.0
Average			13.5			23.3

Table 9에서는 *Streptococcus* spp.의 검출율을 동절기와 하절기를 대비하여 측정한 결과이다. 체표면에서 검출되는 Streptococcus spp.의 검출빈도에서도 하절기에는 검출빈도가 높은 것으로 나타났으며 평균 검출율이 동절기에는 11.5% 하절기에는 33.7%를 보여서 계절별로는 하절기에 높게 나타났다. 부위별 검출율은 muzzle 부위의 검출율이 하절기에 45.5%로 가장 높게 나타났다.

Table 9. *Streptococcus* spp.의 체표면 오염 상태

Site	Winter			Summer		
	Total	No.	%	Total	No.	%
Muzzle	42	3	7.1	22	10	45.5
Side	23	3	13.0	11	2	18.2
Rectum	42	7	16.7	19	7	36.8
Vagina	26	4	15.4	22	7	31.8
Orifice	23	1	4.3	12	3	25.0
Average			11.5			33.7

마. 유방염 원인균의 환경시료에서 계절 및 근원별 검출율

Table 10에서는 *Staphylococcus aureus*이 계절별로 환경요인별로 검출되는 빈도와 검출율을 측정한 결과이다.

Table 10. 환경 중에서 *Staphylococcus aureus*의 오염

Sources	Winter		Summer	
	No. sample	% Sample positive	No. sample	% Sample positive
Bedding	2(9)	22.2	2(9)	22.2
Feedstuff	0(9)	0	3(9)	33.3
Equipment 1.	2(9)	22.2	3(9)	33.3
Equipment 2.	0(9)	0	3(9)	33.3
Housing	2(8)	25.0	4(9)	44.4
water	0(9)	0	0(8)	0
Nonbovine animal	3(9)	33.3	7(9)	77.8
Milk handler	2(9)	22.2	1(8)	12.5
Air	2(9)	22.2	0(9)	0
Average		16.2		29.1

착유환경의 *Staphylococcus aureus* 검출특성은 계절요인에 의한 변화가 크게 나타난다는 것이다. 동절기 검출율의 평균치는 16.2%이고 하절기 검출율은 29.1%로서 큰 차이를 나타내고 있으며, 근원별로 볼 때 음용수의 오염도가 가장 낮은 수치를 보이고, 깔짚, 사료, 공기 및 housing 등

에 고루 분포하고 있으나 특히 개가 매우 높은 *Staphylococcus aureus* 오염도를 나타내고 있는 환경요인이 되고 있다는 점을 중시하여야 한다. 목장내의 출입이 자유로운 개의 원유 및 착유실의 출입을 차단해야하며, 또한 원유에 오염을 일으킬 수 있는 source로서 공기노출이 가장 중요한 요인으로 인식되어야 하며 이 요인을 차단하는 것은 오염도를 감소시키기 위하여 매우 중요할 것으로 사료된다.

Table 11. 환경 중에서 *Streptococcus* spp.의 오염

Sources	Winter		Summer	
	No. sample	% Sample positive	No. sample	% Sample positive
Bedding	5(9)	55.6	2(9)	22.2
Feedstuff	4(9)	44.4	4(9)	44.4
Equipment 1.	4(9)	44.4	4(9)	44.4
Equipment 2.	2(9)	22.2	3(9)	33.3
Housing	0(8)	0	2(9)	22.2
Water	2(9)	22.2	2(8)	25.0
Nonbovine animal	1(9)	11.1	5(9)	55.6
Milk handler	2(9)	22.2	3(8)	37.5
Air	2(9)	22.2	4(9)	44.4
Average		27.5		36.7

Table 11에 제시된 *Streptococcus* spp.의 환경 요인별 검출율에서 동절기 시료의 검출율 평균치는 27.5%이며 하절기 평균치는 36.7%로 나타났다. 근원별로 검출율의 차이는 광범하게 나타나고 있으며 공기로부터 오염가능성이 특히 하절기에 높은 상태라는 점에 유의하여야 한다. 사료, 깔짚 및 착유기 내부에 있어서 검출율이 계절과 상관없이 높음을 알 수 있었다.

4. 고 찰

본 연구 결과에서는 당발효 능력과 hemolysis 용혈 능력을 기준으로 한 재래적인 표준방법에 의한 균종이 동정되었으며 이 방법에 의한 동정

과정은 시간과 비용소모 및 정확도 면에서 보다 간편한 방법으로 대체하는 것이 요청된다. 따라서 균종 수준으로 분자생물학적 방법에 의하여 간편하게 동정이 가능한 것으로 확인되었다.

균종의 정확한 동정에 활용할 수 있는 기법을 선정하기 위하여 primer로 사용하는 oligonucleotide를 16S rDNA을 사용하여 RFLP 방법에 따라 PCR 증폭한 후 제한효소로 절단하고 나타나는 특이한 절편분포를 분석하는 방법과 16S-23S intergenic spacer region의 rDNA primer를 사용하는 방법을 비교하여, 그 정확도를 측정한 결과 후자의 결과가 보다 정확하고 바람직한 방법인 것으로 확인되었다.

또한 이 방법을 이용할 때 *Staphylococcus aureus*에 의하여 생산되는 enterotoxin type을 기준으로 하여 균주를 선별함에 있어서도 재현성이 있는 결과를 얻을 수 있었다. 세균을 동정하고 같은 균종내에서 계통 및 개체간의 차이를 판별하는 방법에 의하여 세균의 생태를 조사할 수 있다. 분석방법으로서 colony의 형태, bacteriophage typing, 항생제감수성 조사(antibiogram), 효소 및 당 발효성을 조사하는 생화학적 검사와, plasmid의 분포조사, 제한효소 절단형, PCR을 이용한 DNA 다형현상 조사 및 restriction fragment length polymorphism 등이 있다.

Bacteriophage typing은 국제적으로 공인된 실험실에서만 수행할 수 있는 제한성이 있고 항생제 감수성과 생화학적 방법은 배양조건과 생리적인 변화에 의한 영향을 받아 반복성이 낮다. Plasmid분석 등 DNA 분석법은 환경에 의해 영향을 받지 않고 계통 수준에 분류할 수 있는 방법으로서 많은 연구가 진행되고 있다.

리보솜의 RNA에서 유도된 probe를 사용하여 Southern blot된 세균의 DNA 절편에 hybridize하여 rDNA 유전자의 제한효소 절단형을 조사하는 방법(ribotyping)이 있다. *E. coli*의 16S-23S rRNA를 ribotyping의 probe로서 사용되고 있다 (Fred 등, 1995). 16S rRNA에 상보한 oligonucleotide primer를 사용하여 PCR로 16S rDNA를 증폭한 후 제한효소로 절단하여 전기영동 하여 종과 계통의 수준에서 분류할 수 있다. Young 등(1994)은 PCR로 증폭된 16S rDNA를 *Hha*I, *Rsa* 및 *Msp*I으로 절단하여 agarose 전기영동 하여 분석하므로서 소의 유방염에서 분리한 7종의 *Streptococcus*, 3종의 *Enterococcus*, 및 1종의 *Aerococcus*를 동정할 수 있었으며 이러한 기술은 amplified rDNA restriction analysis 라고 한다(Fred, 1994). 본 연구에서는 이를 이용하여 Streptococci 균주들의 동정을 확인하고자 한다.

임상형 유방염에 주요 원인이 되는 *Staphylococcus aureus*는

enterotoxin A와 B Type으로 나타났으며, enterotoxin A와 B에 대한 발병 기작에 대한 연구의 필요성을 갖게 되었다.

임상형 유방염의 원인균의 중간 전달 매개체로 각 목장의 non bovine animal(dog)도 관여될 수 있음을 알 수 있었다.

5. 적 요

우리 나라 경기도 일원의 낙농목장에서 동절기와 하절기에 우유 시료, 체표면 시료 및 환경 시료 등으로 구분하여 총수는 572점을 채취하여 동정하고 그 분포특성과 분자생물학적인 동정방법에 의한 동정의 가능성을 시험하여 다음과 같이 그 결과를 얻었다. 전염성 유방염의 대표적인 원인균이 되는*Staphylococcus aureus*와 *Str. agalactiae* 환경형 유방염의 원인균이 되는 *Str. uberis*와 *Str. dysagalactiae*의 시료 중 검출율을 분석하였던 바 29.2%, 3.2%, 11.4% 및 6.8%로 나타났으며 하절기의 검출율이 높아져 있는 경향을 보였다.

균주별로 그 유전자 type을 구분하고 적절히 예방하기 위한 대책 수립의 기초 자료로 활용하기 위하여 *Staphylococcus aureus* 46 균주, *Str. agalactiae* 7 균주, *Str. uberis* 20 균주 및 *Str. dysagalactiae* 21 균주 이외 표준균주를 확보하여 보존균주로 확보하였다.

균속 및 균종 수준으로 유방염 원인균을 신속 간편한 동정방법의 적용 가능성을 검토하여 16S-23S intergenic spacer region의 rRNA primer STAA-AuI, STRU-UbI 및 STRD-DyI를 사용함으로서 가능하였다. 또한 표준균주를 이용한 실험에서 *Staphylococcus aureus*가 생산하는 enterotoxin type을 결정하는 것도 PCR 방법에 의하여 가능한 것으로 확인되었다.

제 2 절 *Staphylococcus aureus*와 Streptococci Genomic DNA의 Pulsed Field Gel Electrophoresis 분석과 오염경로

SUMMARY

Pulsed field gel electrophoresis of *Sma*I digested genomic DNA of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp. was undertaken for genome characterization and genotyping. Contamination route of the pathogens into raw milk was postulated.

*Sma*I was chosen for the PFGE analysis of genomic DNA of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp. The optimum condition for PFGE was found to be pulse time of 5-40 second and running time of 22 hours.

Sizes of the genomic DNA of *Staph. aureus and Streptococcus* spp. averaged 2.3Mb. The genotyping results indicated that 52 strains of *Staphylococcus aureus*, 18 strains of *Str. uberis* and 22 strains of *Str. dysagalatiae* were typed into 19, 7 and 11 genotypes, respectively.

1. 서론

PFGE방법은 genomic DNA의 특성을 분석하여 균주의 동정과 genotype 결정을 위한 역학적 연구 도구로서 광범하게 활용도가 높으며 그 이유는 균주 분별력이 매우 높고 재현성이 높아 질병을 야기하는 균주의 분류와 동정에 있어 탁월한 결과를 제시해주는 방법으로 인정되고 있다 (Bourgeois 등, 1993: Charles 등, 1988: Cassandra와 Condemine, 1990).

시험하는 균주를 agarose에 embedding 시킨 후 그 상태로 세포벽을 용해하여 용균시키고 매우 드물게 절단하는 제한효소로 절단한 후 염색체 DNA를 함유하는 agarose slice 상태로 전기영동용 buffer에 잠긴 상태에서 절편을 분리한다. Agarose 시료 투입 함몰 부위에 slice를 정치시킨 후 제한 효소에 의해 절단된 절편이 일정한 간격으로 그 전류의 방향이 변경되는 CHEF(Coutour Clamped Homogenous Electrophoresis) 전기영동 장치에 의해서 절편이 확연하게 분별되어 band pattern이 형성된다.

각 균주가 생성한 band pattern을 분석함에 있어서 표준화된 분석 기준이 설정되어 있지 않다. 많은 수의 시료에 대한 분석결과를 비교 처리함에 있어서는 software를 사용하여 각 절편의 분포와 크기를 분석하여 절편분포성향의 차이를 dendrogram으로 작성하여 typing 하는 방법이 가장 효과적인 결과처리방법으로 인정되고 있다(Bautsch 등, 1988: Dingwall 등, 1990).

본 연구에서는 분리하여 동정된 유방염 원인균에 대하여 genome 구조상의 특성을 구명하기 위하여 pulsed field 전기영동을 이용하여 균주의 동정과 균주typing을 시도하고 동일 type의 존재부위를 확인함으로서 목장환경 중에서 우유에로 유방염 원인균의 오염경로를 확인하기 위하여 수행되었다.

2. 재료 및 방법

가. Genomic DNA의 agarose block 제조

시험균주를 overnight 배양한 후 chloramphenicol 100ug/ml 농도로 첨가한 후 2시간 더 배양한다. 1.5ml 배양액을 취한 후 원심 분리(15000rpm, 4℃, 15분)하여 cell을 회수하고, 1M NaCl과 10mM Tris(pH 7.6)로 세척한다. 다시 1M NaCl과 10mM Tris(pH 7.6) 300㎕에 현탁시킨 후 저융점 agarose를 1M NaCl과 10mM Tris에 2%가 되도록 가한 후 boiling water bath에서 용해시키고 50℃ incubator에서 보관하면서 동량의 균액과 혼합한다. 이 혼합액을 sample mold에 분주하여 block을 형성시킨다. 형성된 block을 lysozyme (1mg/ml)과 mutanolysin 100U가 함유된 EC lysis buffer(6mM Tris pH 7.6, 1M NaCl, 0.1M EDTA pH 7.5, 1% Sarkosyl)에 넣어 16시간 정치한 후 ES buffer(0.5M EDTA pH 9.2, 1% Sarkosyl)에 proteinase K(1mg/ml)를 함유한 용액으로 옮기고 37℃에서 48-72시간 작용시킨다. 다시 TE(10mM Tris pH 8.0, 0.1mM EDTA pH 7.5)에 1mM phenylmethylsulfonyl(PMSF)를 함유한 용액에서 7시간 동안 실온에서 정치시키고 새로운 PMSF 용액으로 overnight 시킨다. TE를 이용하여 2시간 간격으로 실온에서 3회 세척한 후 0.5M EDTA(pH 8.0)과 1% Sarkosyl 용액에서 보관한다(4℃).

나. Genomic DNA의 제한효소 처리 및 PFGE

조제된 block을 1-2mm으로 절단한 후 TE로 2회, 각 제한효소 1X buffer로 1회 세척한다. 제시된 제한 효소 20U를 적당한 buffer와 온도에서 5-6시간 작용시킨다. 제한효소 처리된 block은 TE로 1회, 0.5X TBE용액에 1회 세척한 후 전기영동을 실시한다. 각 균주의 genomic DNA의 band pattern을 분석하기 위하여 CHEF DR III system(Bio-Rad, USA)을 활용하여 1.1% agarose gel에서 0.5X TBE 용액을 이용하여 14℃의 온도를 유지하는 상태에서 23시간 전기영동을 실시한다.

다. Genomic DNA의 size 측정 및 분석

PFGE 조건을 6V, 5-40sec, 22h로 맞춘 뒤 Lambda ladder을 size marker로 하여 PFGE를 실시하고 단편의 band를 확인한다. Size 측정은 agarose gel 상에서 나타나는 band의 개별 size를 측정한 후 그 수치를 총합하여 계산한다. 분석된 data의 typing과 dendrogram작성은 Biogene software(Vilberlourmat, France)를 사용하였고, confidence 5%에서 80% 이상의 유사성을 갖는 균주는 동일 균주의 group으로 판정하는 기준에 따라 수행했다(Lefevre등, 1993).

3. 결과

가. *Staphylococcus aureus* 및 streptococci의 genomic DNA 성상

1) 제한효소에 따른 PFGE의 Band pattern과 효소선정

Fig. 1에서 *Not*I이 사용되었을 때 18 균주의 *Staphylococcus aureus*의 genomic DNA 중에 6 균주에서는 절편 생성이 전혀 일어나지 않았고, 절편 생성이 일어난 경우에서도 그 수를 보면 3개로부터 12개 정도의 절편을 생성하였다. 따라서 *Not*I의 경우 바람직한 제한 효소로 선택될 수 없는 것으로 판단되었다.

Fig. 2에서는 *Sfi*I을 사용하여 그 절편 생성 pattern을 나타내었으며, *Sfi*I의 경우에도 절편 생성이 전혀 되지 않은 strain이 18 균주 중에서 6 균주로 나타났고, 절편 생성된 2 균주의 경우 7 절편이 생성되어 그 분해빈도가 과다하게 적게 나타나는 성향을 나타내어 적합치 못한 제한 효소로 밝혀졌다.

Fig. 3에서는 제한효소 *Sma*I으로 *Staphylococcus aureus*의 genomic DNA 분해 성향을 실험한 결과는 제시된 바와 같다. 18 균주에 대하여 모든 균주가 적절한 분해 작용을 나타내어 PFGE pattern을 형성하였고, 그 절편의 수를 보면 11개로부터 17개 범위로 적절한 범위의 PFGE pattern을 생성하였다. 따라서 *Sma*I이 적절한 제한 효소인 것으로 확인되었다.

*Staphylococcus aureus*의 PFGE 분석에 있어서 사용된 제한 효소와 band 생성 수 및 각 band 의 분자량 크기 범위를 보면, *Sma*I이 가장 많이 사용되는 것으로 보고되었으며, *Csp*I도 사용 가능한 것으로 보고되었다 (Manuel 등 1993). 이 결과는 본 시험 결과와 일치한다.

*Sma*I에 의하여 *Staphylococcus aureus* genome을 처리하였을 때 나타나는 band 수의 범위는 15-20개이고 그 절편 크기의 범위는 10-500Kb 인 것으로 보고되었다(Fred 등, 1995)

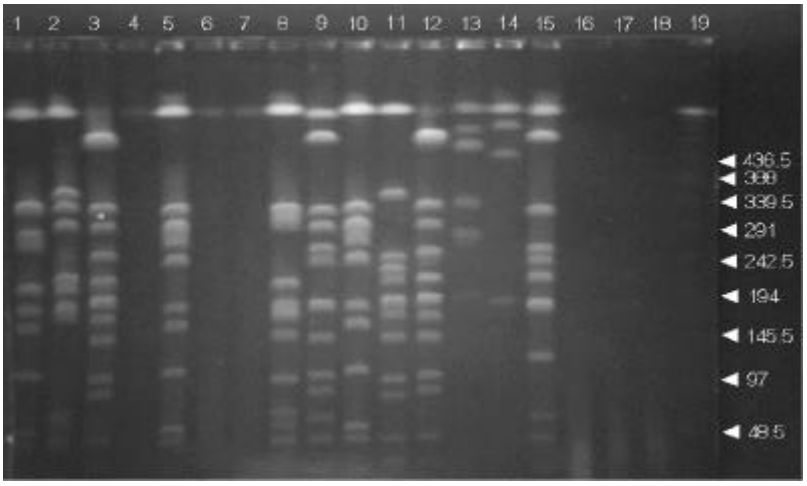


Fig. 1. Pulsed field gel electrophoretogram of *Staph. aureus* genomic DNA digested by restriction endonuclease *Not*I.

Lane 1 ; *S. aureus* CU 1108, Lane 2 ; CU 1106, Lane 3 ; CU 1105, Lane 4 ; CU 1104, Lane 5 ; CU 1183, Lane 6 ; CU 1127, Lane 7 ; CU 1126, Lane 8 ; CU 1147, Lane 9 ; CU 1110, Lane 10 ; CU 1117, Lane 11 ; CU 1122, Lane 12 ; CU 1113, Lane 13 ; CU 1162, Lane 14 ; CU 1161, Lane 15 ; CU 1138, Lane 16 ; CU 1137, Lane 17 ; CU 1177, Lane 18 ; CU 1131, Lane 19 ; Size marker

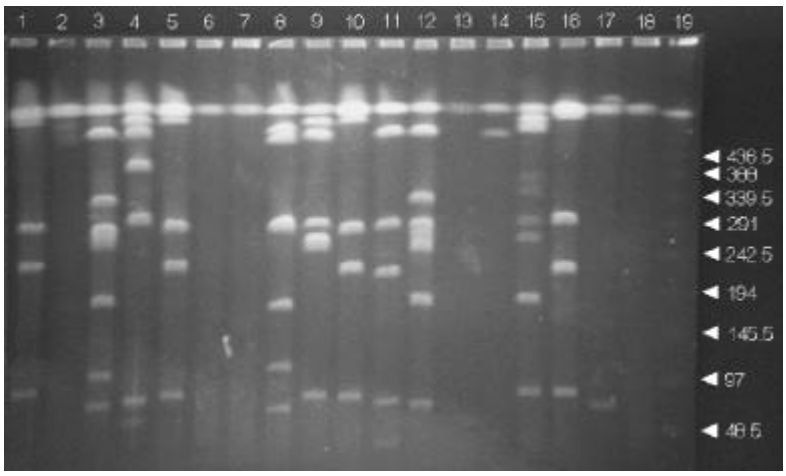


Fig. 2. Pulsed field gel electrophoretogram of *Staph. aureus* genomic DNA digested by restriction endonuclease *Sfi* I

Lane 1 ; *S. aureus* CU 1108, Lane 2 ; CU 1106, Lane 3 ; CU 1105, Lane 4 ; CU 1104, Lane 5 ; CU 1183, Lane 6 ; CU 1127, Lane 7 ; CU 1126, Lane 8 ; CU 1147, Lane 9 ; CU 1110, Lane 10 ; CU 1117, Lane 11 ; CU 1122, Lane 12 ; CU 1113, Lane 13 ; CU 1162, Lane 14 ; CU 1161, Lane 15 ; CU 1138, Lane 16 ; CU 1137, Lane 17 ; CU 1177, Lane 18 ; CU 1131, Lane 19 ; Size marker

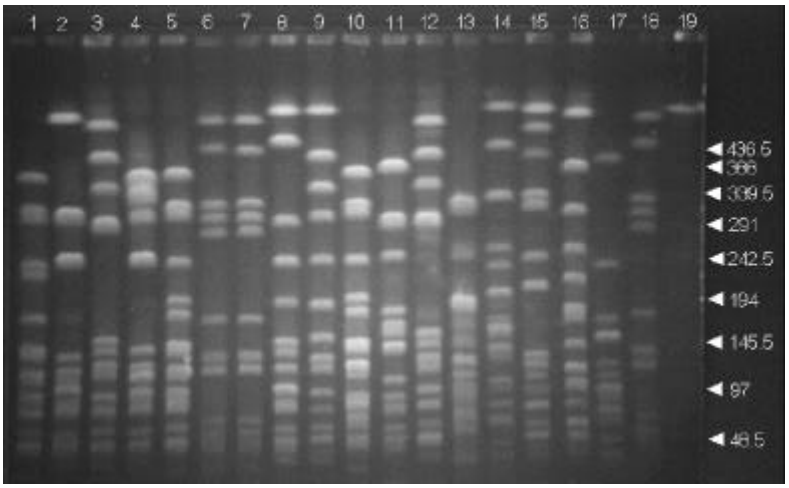


Fig. 3. Pulsed field gel electrophoretogram of *Staph. aureus* genomic DNA digested by restriction endonuclease *Sma* I.

Lane 1 ; *S. aureus* CU 1108, Lane 2 ; CU 1106, Lane 3 ; CU 1105, Lane 4 ; CU 1104, Lane 5 ; CU 1183, Lane 6 ; CU 1127, Lane 7 ; CU 1126, Lane 8 ; CU 1147, Lane 9 ; CU 1110, Lane 10 ; CU 1117, Lane 11 ; CU 1122, Lane 12 ; CU 1113, Lane 13 ; CU 1162, Lane 14 ; CU 1161, Lane 15 ; CU 1138, Lane 16 ; CU 1137, Lane 17 ; CU 1177, Lane 18 ; CU 1131, Lane 19 ; Size marker

2) 최적 pulse time과 전기영동시간 조건 설정

PFGE 분석에 있어서 DNA 분자는 변화하는 전하장에 노출하게 되는데, 전하장에 노출되는 시간을 pulse time이라 하며, 이 요인은 실험 결과에 크게 영향을 미치는 것으로 알려졌다. 적절한 pulse time 수치를 얻기 위하여 3가지 다른 조건의 pulse time에서 동일한 시료를 분석하고, 가장 정확한 수치 표준에 접근한 조건을 선정하였고, 그 결과를 비교하였다. Fig. 4에서는 17개 표준 균주의 genomic DNA를 *Sma*I 처리한 후, pulse time을 각각 1-20 sec, 5-40sec, 및 10-120 sec로 다르게 하여, 전기영동을 실시한 후 생성된 band pattern의 변화 성향이 나타난 결과이다. Fig. 4에서 나타난 3개의 Genomic DNA band pattern을 보면, 같은 균주를 사용하여 전기영동을 한 결과이며 pulse time 조건을 다르게 조절한 결과 영향이 크게 나타나는 것을 알 수 있다.

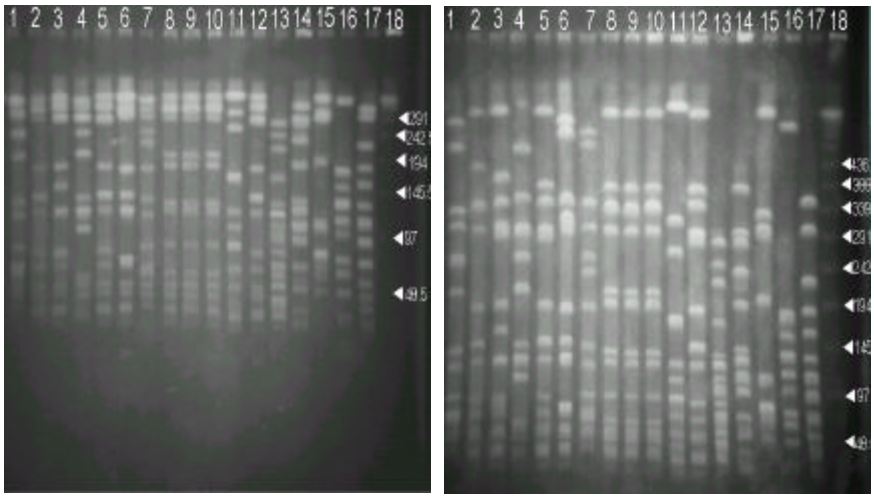
Fig. 4에 A에는 pulse time을 1-20sec, 16 시간동안 영동한 결과로서, 분자량이 큰 DNA가 agarose gel을 통과하지 못하여 몰려 있는 형태를 띄고 있는데, 이유는 pulse가 바뀌는 시간이 너무 빨라서 분자량이 큰 DNA가 agarose gel을 통과하지 못하는 것으로 판단된다. 반대로 분자량이 작은 DNA는 agarose gel을 쉽게 통과하여 band pattern이 매우 명확하게 형성되어 있음을 알 수 있는데, 이러한 영동 조건은 분자량이 작은 DNA의 size를 정확하게 측정하고자 할 때 적합한 조건이라고 할 수 있다.

Fig. 4에 있는 B사진은 pulse time을 5-40sec, 22 시간동안 영동한 결과로서, 분자량이 큰 DNA fragments와 분자량이 작은 DNA fragments가 적당한 간격을 유지하고 있는 band pattern을 볼 수 있다.

Fig. 4에 있는 C사진은 pulse time을 10-120sec, 22 시간동안 영동한 결과로서, 분자량이 큰 DNA fragments가 전장 주기가 바뀌는 pulse time이 길어서 agarose gel을 쉽게 통과하여, band pattern이 매우 명확하게 형성되고 있음을 알 수 있는데, 이러한 영동 조건은 분자량이 큰 DNA의 size를 정확하게 측정하고자 할 때 적합한 조건이라고 할 수 있다.

유방염 표준균주 17종에 대한 전기영동을 검토한 결과 이상적인 전기영동 조건은 pulse time은 5-40sec이고 시간은 22시간이 었다.

A B



C

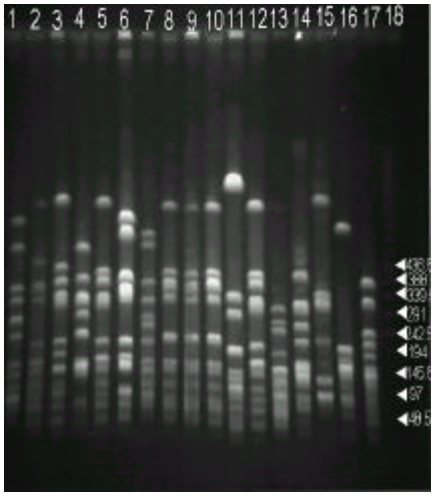


Fig. 4. PFGE electrophoresis band pattern of *Staph. aureus* strains and Streptococci spp. at varied pulse conditions; A at 1-20sec pulse time 16 h, B at 5-40sec pulse time 22h, C at 10-120sec pulse time 22h

Lane 1; FRI 913, lane 2; ATCC 13515, lane3; MNHCCH, lane 4; MNDCN, lane 5; pMIN 403, lane 6; FRI 472, lane 7; FRI 326, lane 8; 805(T) lane 9; 807(C), lane 10; 877AS, lane 11; FRI MN 8, lane 12; RN 4220, lane 13; NVRI, lane 14; ATCC 12228, lane 15; ATCC 13813, lane 16; ATCC 27957 , lane 17; ATCC 27958, lane 18; lamda ladder.

3) *Staphylococcus aureus*의 genomic DNA 분자량 측정

Staphylococcus aureus 분리균주 CU 1101 외 17균주에 대한 genomic DNA band pattern과 genomic DNA size를 측정한 값은 Table 1에 제시되었다. *Streptococci* spp. CU 2101 외 17 균주에 대한 genomic DNA band pattern은 Fig. 5에 제시되었고, genomic DNA size를 측정한 값은 Table 2에 제시되었다. *Staph. aureus* CU 1101 외 17 균주에 대한 genomic DNA band pattern을 보면, 1.0Mb에서 3.1Mb까지 광범위한 변화 폭을 보였으며, 1.0Mb에서 2.0Mb 6균주, 2.0Mb에서 3.0Mb 7균주, 3.3Mb 1균주의 band pattern을 형성하였다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이 *Staph. aureus*의 genome 구조는 매우 다양한 형태로 이루어 진 것으로 확인되었으며, 독특한 type으로서 균주를 분리, 동정 할 때 기초 자료로서 이용 가치가 높다고 판단된다. *Streptococci* spp. CU 2101외 17균주에 대한 genomic DNA band pattern을 보면, 1.0Mb에서 3.3Mb까지 광범위한 변화 폭을 보였으며, 1.0Mb에서 2.0Mb 9균주, 2.0Mb에서 3.0Mb 6균주, 3.3Mb 2균주의 pattern을 형성하였다. Fig. 6에서 보면 Lane 9의 CU 2108과 Lane 10의 CU 2109의 DNA band pattern은 육안으로도 확인되듯이 동일하고, Table 2에서 보듯이 image analyzer를 이용하여 분석한 자료도 거의 동일함을 보여서 같은 균주라고 판단할 수 있다. *Str. pneumoniae* 23 isolate 에 대하여 PFGE 분석한 결과 22개의 다른 type으로 구분 가능한 것으로 발표된 바 있다(Lefevre 등, 1993). 이 시험에서 적절한 제한효소로 선택된 것은 *Apa*I 과 *Sma*I으로 확인되었으며 동일한 균주를 시차를 두고 여러 번 반복 시험한 후 그 pattern을 관찰하였던 바 그 재현성은 확실한 것으로 보고되었다. *Staph. aureus*를 이용한 재현성 시험에서 그 재현성이 확인되었다.

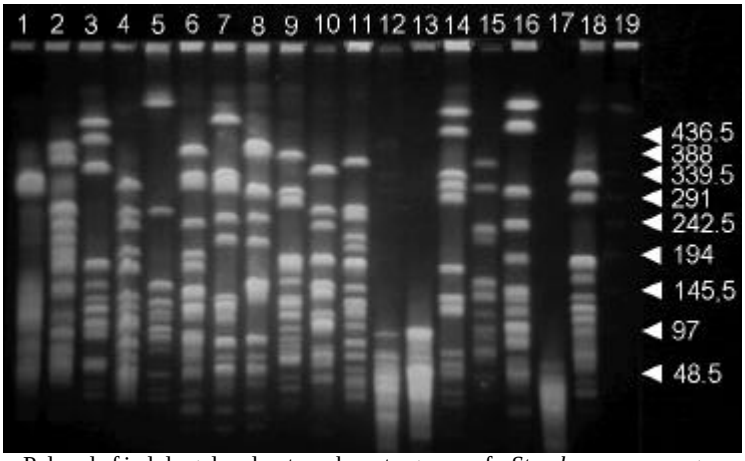


Fig. 5. Pulsed field gel electrophoretogram of *Staph. aureus* genomic DNA digested by restriction endonuclease *Sma*I.

Lane 1 ; *S. aureus* CU 1101, Lane 2 ; CU 1107, Lane 3 ; CU 1109, Lane 4 ; CU 1104, Lane 5 ; CU 1114, Lane 6 ; CU 1115, Lane 7 ; CU 1116, Lane 8 ; CU 1118, Lane 9 ; CU 1119, Lane 10 ; CU 1120, Lane 11 ; CU 1121, Lane 12 ; CU 1123, Lane 13 ; CU 1130, Lane 14 ; CU 1128, Lane 15 ; CU 1129, Lane 16 ; *S. aureus* NCTC 9393, Lane 17 ; *S. epidermidis*, Lane 18 ; CU 1133, Lane 19 ; Size marker

Table 1. Size(kb) of restriction fragments obtained after digestion with *Sma*I of the chromosome of *Staph. aureus* strains.

Strain	Band size(kb)	Total size
CU 1107	410 384 321 308 276 244 220 195 181 152 116 97 93 79 59	3, 135
CU 1109	472 430 367 186 157 136 126 108 95 61 33 23 3	2, 197
CU 1104	329 270 249 201 182 142 128 117 108 86 67 54 47	1, 980
CU 1114	520 271 158 135 121 102 92 76 45 28 18	1, 566
CU 1115	408 346 252 195 180 149 128 88 70 51 23 5	1, 895
CU 1116	478 348 335 260 223 140 131 114 87 67 56 36 4	2, 279
CU 1118	421 317 258 218 156 151 89 68 55 36 6	1, 775
CU 1119	395 308 288 187 160 134 118 100 88 80 65 44 30 15	2, 012
CU 1120	358 271 244 192 158 149 118 109 78 70 62 44 6	1, 859
CU 1121	375 275 260 224 208 187 152 134 123 105 84 68 53 38 21	2, 307
CU 1128	494 450 348 323 297 178 140 124 70 57 49 25 16	2, 571
CU 1129	371 312 236 217 159 142 118 99 93 72 44 20	1, 883
NCTC 9393	514 463 308 247 188 147 121 104 86 59 47 3	2, 287
CU 1133	344 295 189 165 140 126 114 97 69 36 27 24 3	1, 629

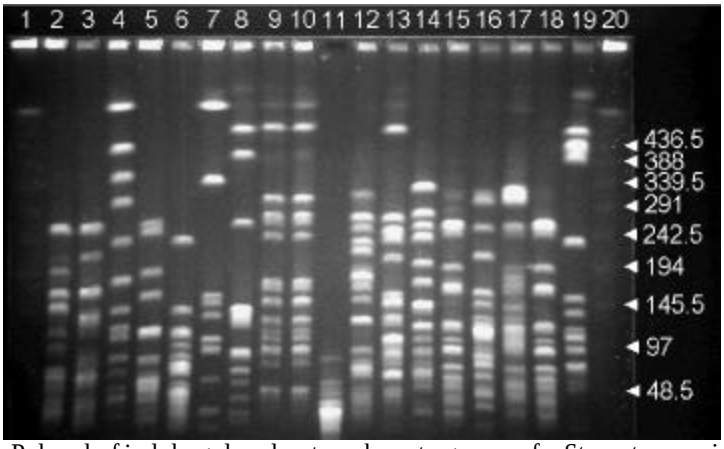


Fig. 6. Pulsed field gel electrophoretogram of *Streptococci* spp. genomic DNA digested by restriction endonuclease *Sma*I.

Lane 2 ; Streptococci spp. CU 2101, Lane 3 ; CU 2102, Lane 4 ; CU 2103, Lane 5 ; CU 2104, Lane 6 ; CU 2105, Lane 7 ; CU 2106, Lane 8 ; CU 2107, Lane 9 ; CU 2108, Lane 10 ; CU 2109, Lane 11 ; CU 2110, Lane 12 ; CU 2111, Lane 13 ; CU 2112, Lane 14 ; CU 2113, Lane 15 ; CU 2114, Lane 16 ; CU 2115, Lane 17 ; CU 2116, Lane 18 ; CU 2117, Lane 19 ; CU 2118, Lane 20 ; Size marker

Table 2. Size(kb) of restriction fragments obtained after digestion with *Sma*I of the chromosome of *Streptococci* ssp. strains.

Strain	Band size(kb)	Total size
CU 2102	257 206 192 162 143 114 97 70 65 53 37 34 24	1, 454
CU 2103	257 211 163 131 115 85 76 63 30 19	1, 150
CU 2104	554 437 356 307 235 180 141 120 109 85 70 51 39	2, 684
CU 2105	265 253 190 160 115 84 60 51 40 25 17	1, 260
CU 2106	239 141 114 100 89 77 72 51 45 35 25	988
CU 2107	554 345 159 150 135 109 95 63 26 7	1, 643
CU 2108	490 421 269 142 133 93 71 59 41 23 13	1, 755
CU 2109	564 500 313 282 272 245 177 173 153 129 116 109 97 80 50	3, 260
CU 2110	562 498 310 280 271 245 177 171 152 129 117 109 98 81 49	3, 249
CU 2112	318 277 257 236 222 183 175 154 129 95 73 41 23	2, 183
CU 2113	493 275 253 240 214 160 149 130 106 93 67 49 45 9	2, 283
CU 2114	331 283 262 241 204 177 144 122 108 93 78 70 53 35 24 9	2, 234
CU 2115	257 198 168 125 107 96 76 63 53 39 23	1, 205
CU 2116	309 260 215 163 148 131 118 111 88 78 67 46 32 9	1, 775
CU 2117	325 309 259 195 182 173 143 128 119 109 100 71 56 43 25	2, 237
CU 2118	259 196 168 122 105 95 74 63 52 38 21	1, 193

나. *Staph. aureus*와 *Streptococcus* spp.의 PFGE에 의한 genotyping

1) *Staph. aureus*의 절편분포에 의한 genotyping

Table 3에는 총 52 균주에 대한 *Sma*I에 의하여 절단된 genome 단편의 분포 pattern에 따라 dendrogram 작성 결과 19개의 genotype으로 구분되었다. Dendrogram 작성시의 confidence는 5%로 하고 약 80%의 상동성을 갖는 균주는 동일 type으로 간주하여 typing하였다.

a Genotype으로 분류된 균주는 CU 1110 등 15 균주이며 b Type 에는 CU 1107 등 7 균주가 소속되며 c Type에는 CU 1121 등 4 균주가 포함되었으며 d Type에는 CU1119 등 4 균주를 포함하였다.

e Type에는 CU 1176 등 3 균주가 포함되며 f type에는 CU 1191 등 3개 균주가 포함되며, g, h, I 및 j Type은 각각 2개 균주만을 포함하며, k, l, m, n, p, q, r 및 s Type은 각각 단일균주로 이루어지는 독특한 구조를 가진다.

Tammy 등 (1995)는 *Stahylococcus aureus*를 bacteriophage typing 하는 방법과 PFGE에 의한 genotyping 방법을 대비하여 검토한 결과 PFGE 방법의 우수성을 입증하였으며 phage typing의 경우에는 typing이 불가능한 균주가 있으나 PFGE의 경우는 typing 불능의 경우가 거의 존재하지 않는다는 장점을 제시하였다.

Tynkkynen 등 (1999)은 *Lactobacillus casei*의 분류에 있어 PFGE와 ribotyping 및 RAPD방법을 비교 균주의 분별 능력면에서 PFGE가 가장 민감한 방법으로 지적한 바 있다.

균주 분리 typing 연구의 목적은 역학적으로 연관성이 있는 수집된 분리 균이 유전적으로 연관되고 있다는 실험 결과 얻은 증거를 제시함으로서 동일 균주라는 사실을 증명하는 것으로서, 이상적인 band pattern은 동일 균종일 경우 PFGE band pattern은 상호간 분별되지 않을 정도로 동일해야 하고, 역학적으로 동일균종이 아닌 경우 PFGE band pattern은 확연하게 다르게 나타나야 한다(Fred 등, 1995).

Genomic DNA를 분석할 때 "분별 불가", "밀접히 연관됨", "연관가능성" 및 "연관성 없음" 등 4가지 유형에 기준을 두고 분석을 하게 된다 (Fred 등, 1994). "분별 불가" 는 분리 균의 band size와 절편 pattern도 동일하게 나타나는 경우로서 발병 균주와 동일한 균주로 보는 것으로서, 이때 생성되는 genomic DNA 절편 수에 전혀 차이가 없다. "밀접히 연관됨"은 분리균주와 발병균주간의 차이가 유전적인 변화 1개가 일어난 경우

에는 밀접하게 연관된 균주로 판정한다. 이때 생성되는 genomic DNA 절편은 2-3개의 다른 band pattern이 형성된다. "연관 가능성"으로 구분된 경우는 발병균주와 분리균주간에 2가지의 유전적인 변화를 나타내는 경우이며, 이때 생성되는 genomic DNA 절편수는 4-6개 정도의 차이를 보인다. "관계없음"으로 판정되는 경우는 발병균주와 분리균주 사이에서 3가지 이상의 유전적 변화가 생성된 경우이며 별개의 균주로 판정한다. 이때 생성되는 genomic DNA 절편수는 7개 이상의 차이를 보인다(Fred 등, 1994).

*Staph. aureus*와 같은 병원성 균주에 대해서 PFGE에 의한 연구는 많이 되었지만, 광범위하게 시료를 분리하거나 기술적으로 비교 분석한 연구는 거의 없었다. 그럼에도 불구하고 PFGE가 동일 유전자를 갖은 biotype이나 항균성과 같은 표현형질 표지인자(phenotype marker)가 되었다(Robert 등, 1995).

PFGE의 원리를 활용한 변형된 전기영동 기법이 다양하게 발전되어 활용되고 있으며, 그 명칭은 다음과 같다. FIGE(Field Inversion Gel Electrophoresis), TAFE(Transverse Field Electrophoresis), CHEF(Coutour Clamped Homogenous Electrophoresis), 및 RGE(Rotating Gel Electrophoresis)등의 전장변환 전기 영동장치가 고안되어 있으며, CHEF 형이 가장 보편적으로 활용되고 있다.

Fig. 7에서는 *Sma*I의 PFGE pattern을 근거로 하여 작성된 *Staph. aureus*의 dendrogram이며 이 결과에 의하여 genotyping 되었다.

2) *Streptococcus uberis*의 genotyping과 사육환경 중의 분포

Tenover(1994) 등이 제시한 기준에 따라 19 *Str. uberis* 균주의 *Sma*I 처리된 genomic DNA 절편의 크기분포에 따라 a, b, c, d, e, f 및 g 7개의 type으로 분리가 가능하였고 결과는 Table 4에 제시되었다.

a Type에 속하는 균주는 CU 2148, CU 2140, CU 2137, CU 2123 및 CU 2131 등 5개 균주이며 절편의 수는 11개 부터 13개까지 생성되었고 그 크기는 29kb로부터 557kb의 DNA 절편이 생성되었다. Genomic DNA의 근연성은 Fig. 8에 제시된 dendrogram에 의하여 측정 가능하였다.

Type	Strains
i	CU 1101
j	CU 1118
k	CU 1139
l	CU 1155
b	CU 1107
b	CU 1140
b	CU 1129
b	CU 1141
b	CU 1192
b	CU 1180
b	CU 1144
c	CU 1121
c	CU 1174
c	CU 1170
c	CU 1172
h	CU 1182
h	CU 1154
e	CU 1176
e	CU 1152
e	CU 1173
m	CU 1134
n	CU 1109
a	CU 1110
a	CU 1158
a	CU 1159
a	CU 1115
a	CU 1190
a	CU 1157
a	CU 1136
a	CU 1189
a	CU 1150
a	CU 1133
a	CU 1116
a	CU 1138
a	CU 1137
a	CU 1120
a	CU 1188
o	CU 1128
p	CU 1114
d	CU 1119
d	CU 1165
d	CU 1167
d	CU 1166
f	CU 1191
f	CU 1164
f	CU 1175
g	CU 1160
g	CU 1143
g	CU 1142
q	CU 1123
r	CU 1124
s	CU 1135

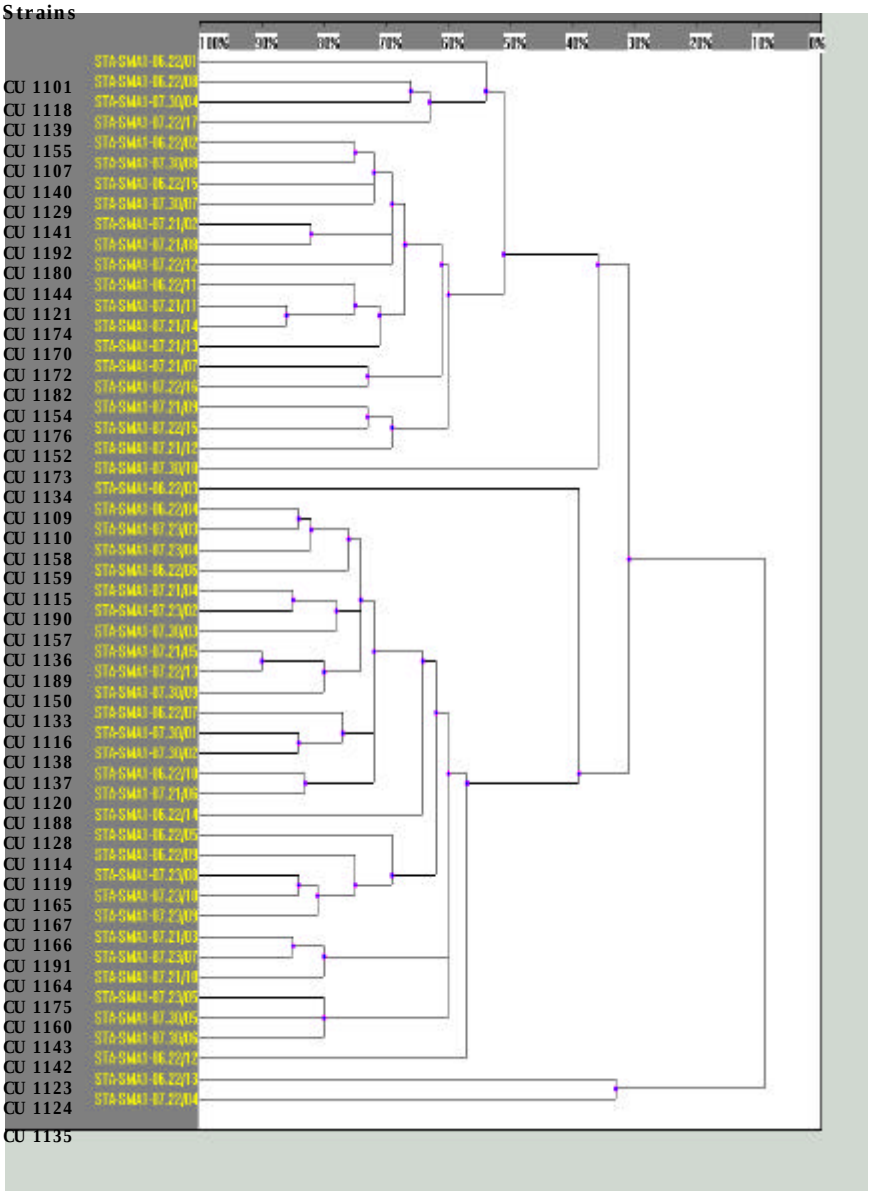


Fig. 7. Dendrogram of *Staphylococcus aureus* based on the *Sma*I-digested genome DNA fragment pattern by PFGE

Table 3. Determination of genotype of *Staph. aureus*.

Type	Isolate No.	Source	Farm	Type	Isolate No.	Source	Farm
a	CU 1110	Dog	PLX	d	CU 1119	Dog	WS
	CU 1158	Housing	CY		CU 1165	Rectum	CY
	CU 1159	Milking machine	CY		CU 1167	Muzzle	CY
	CU 1115	Vagina	WS		CU 1166	Vagina	CY
	CU 1190	Housing	GC		CU 1176	Bedding	YO
	CU 1157	Feedstuff	CY	e	CU 1152	Muzzle	SW
	CU 1136	Raw milk	SGJ		CU 1173	Orifice	YO
	CU 1189	Dog	GC		CU 1191	Muzzle	GC
	CU 1150	Bedding	SW	f	CU 1164	Muzzle	CY
	CU 1133	Housing	SGJ		CU 1175	Milking machine	YO
	CU 1116	Muzzle	WS		CU 1160	Dog	CY
	CU 1138	Raw milk	SGJ	g	CU 1143	Orifice	SGJ
	CU 1137	Raw milk	SGJ		CU 1142	Rectum	SGJ
	CU 1120	Feedstuff	WS	h	CU 1182	Dog	CHK
	CU 1188	Feedstuff	GC		CU 1154	Orifice	SW
	CU 1107	Muzzle	CA	i	CU 1101	Bedding	CA
	CU 1140	Muzzle	SGJ	j	CU 1118	Milking machine	WS
	CU 1129	Housing	JL	k	CU 1139	Raw milk	SGJ
b	CU 1141	Muzzle	SGJ	l	CU 1155	Rectum	SW
	CU 1192	Rectum	GC	m	CU 1134	Milking machine	SGJ
	CU 1180	Raw milk	CHK	n	CU 1109	Rectum	CA
	CU 1144	Bedding	SW	o	CU 1128	Raw milk	JL
	CU 1121	Muzzle	WS	p	CU 1114	Raw milk	PLX
c	CU 1174	Raw milk	YO	q	CU 1123	Raw milk	WS
	CU 1170	Handler	YO	r	CU 1124	Raw milk	JL
	CU 1172	Orifice	YO	s	CU 1135	Dog	SGJ

b Type에 속하는 균주는 CU2116, 2143 및 2145 등 3 균주로서 11-13개의 절편이 생성되었고 그 크기는 37kb로부터 650kb의 크기를 나타내었다.

c Type에 속하는 균주는 CU 2142과 CU 2144 2 균주이며 그 절편의 수와 크기는 10-12개이며 44kb로부터 584kb로 나타났다.

d Type에 속하는 균주는 CU 2135, CU 2136, CU 2146 및 CU 2149이며 절편수는 11-13이고 크기는 42kb에서 546kb이었다.

e Type에는 CU 2124와 CU 2133이 소속되며 9-11개의 절편이 생성되고 크기는 54kb에서 328kb였으며 f Type과 g Type은 각 1 균주가 소속되었

다.

Table 4. Typing and Distribution of *Str. uberis*

PFGE types	Anti Chl ** profile	Isolate designation	Origin	Farm*
a	S	CU 2123	Feedstuff	CA
	S	CU 2131	Milking machine	YO
	S	CU 2137	Vagina	CA
	S	CU 2140	Rectum	CA
	S	CU 2148	Orifice	YO
b	S	CU 2116	Raw milk	CY
	S	CU 2143	Rectum	CY
	S	CU 2145	Vagina	CY
c	S	CU 2142	Muzzle	CY
	R	CU 2144	Muzzle	CY
d	S	CU 2135	Milking machine	CHK
	R	CU 2136	Orifice	CA
	R	CU 2146	Vagina	YO
e	S	CU 2149	Rectum	YO
	S	CU 2124	Milking machine	CA
	S	CU 2133	Handler	YO
f	S	CU 2117	Raw milk	CY
g	S	CU 2121	Raw milk	CHK

* CA; Chungang, WS; Wongsoo, SW; Sungwon, CY; Choya, JL; Joolim, YO; Yungoh, SGJ; Segongju, GC; Gunchun, CHG; Chyungyung, PLX; Pelix,

** Chloramphenicol sensitivity; R-resitant S-susceptible

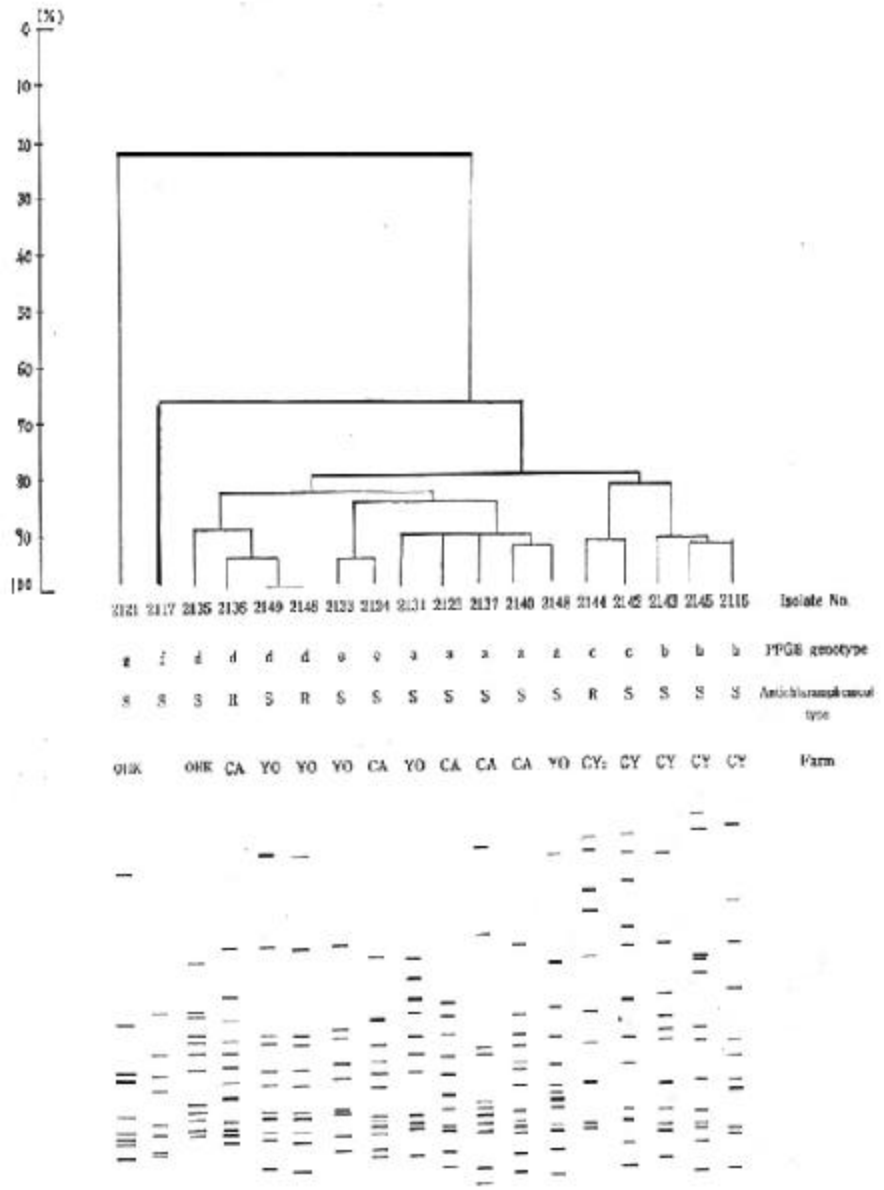


Fig. 8. Dendrogram analysis of 19 isolates of *Str. uberis* comparing relatedness by DNA profiling, antibiotype and antichloramphenicol-type. R; resistant S; susceptible, Name of farm; given in bottom of Table 4.

모든 *Str. uberis* 균주는 pulsed field gel electrophoresis에 의하여 typing이 가능하였다. 그 결과는 Table 4에서 제시된 바와 같고, a Type은 동일한 목장의 사료, 직장 및 질에서 분리되고 있어 소의 체표면과 사료에서 분포되어있어 유두와 착유기 내부에서도 동일한 type이 발견되어 오염경로의 추정이 가능하다(Tanskanen 등, 1990: Cassandra와 Condemine, 1990).

b Type의 분포를 보면 그 오염경로의 추적이 더욱 분명하게 되며 질과 직장에서 분리된 시료에서 분리된 동일부류의 균주가 동일 목장의 원유 중에서 분리되어 소의 신체 중 일부에 존재하던 병원균이 우유에까지 오염될 수 있음을 보여 주었다. d Type의 경우 직장과 질에서 채취된 시료에 존재하는 균주가 유두와 착유기 내에서 채취된 시료 중에 존재한다는 시험결과는 병원균의 오염경로에 대한 적절한 관리의 중요성을 제시해주고 있다.

20개의 분리균주는 그 절편의 수와 크기분포양상에서 고도의 이질성을 나타내었으며 그 유전적인 연관성이 80%를 기준으로 할 때 9개의 genotype으로 분류 가능하였다. a Type은 2개의 subtype으로 구분할 수 있으며 b Type은 2개의 subtype이 있으며 d Type은 3개의 subtype으로 구분이 가능하였다. 특히 d Type에 속하는 CU 2146과 CU 2149는 100% 동일하고 e Type의 CU 2124와 CU 2133은 95% 수준으로 동일한 profile을 가지며 CU 2136과 CU 2149간에도 95% 수준의 상동성을 갖는 것으로 확인되었다.

동일한 profile을 갖는 영오목장 유우의 질에서 유래된 CU 2146과 동일목장에서 사육되는 유우의 질에서 분리된 CU 2149 간의 chloramphenicol 감수성의 차이를 보이는 것에 주목해야 할 것으로 보이며 전자는 저항성이 있으나 후자에는 감수성을 나타내고 있다.

3) *Str. dysagalactiae*의 genotyping과 사육 환경 중의 분포

목장에서 채취한 우유 및 유생산 환경에서 채취된 시료는 동절기에 채취된 시료 293점과 하절기에 채취된 시료 279점 총 572점의 시료가 채취되었으며 이 중 *Str. dysagalactiae*가 존재하는 시료는 동절기 시료 중 15점(5.1%)와 하절기 시료 중에서 24점(8.6%)에서 분리 가능하였다.

Tenover(1994) 등이 제시한 기준에 따라 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j 및 k 11개의 type으로 분리가 가능하였고 결과는 다음과 같다. a Type에 속하는 균주는 CU 2115, CU 2147, CU 2112, CU 2113, CU 2108, CU

2109 및 CU 2125등 7개 균주이며, 절편의 수는 10개부터 14개까지 생성되었고 그 크기는 30kb로부터 597kb의 DNA절편이 생성되었다. Genomic DNA의 근연성은 Fig. 9에 제시된 dendrogram에 의하여 측정 가능하였다. b Type에 속하는 균주는 CU 2120, CU 2127, CU 2150 및 CU 2134등 4개 균주이며, 11-13개의 절편이 생성되었고 그 크기는 37kb로부터 650kb의 크기를 나타내었다.

Table 5. Typing and Distribution of *Str. dysagalactiae*

PFGE types	AntiChl** profile	Isolate designation	Origin	Farm*
	S	CU 2115	Raw milk	CY
	M	CU 2147	Muzzle	YO
	S	CU 2112	Raw milk	SW
a	S	CU 2113	Raw milk	SW
	R	CU 2108	Raw milk	PLX
	S	CU 2109	Raw milk	PLX
	S	CU 2125	Dog	PLX
	S	CU 2120	Raw milk	YO
b	S	CU 2127	Bedding	PLX
	S	CU 2150	Muzzle	GC
	S	CU 2134	Water	CHK
	S	CU 2141	Raw milk	JL
c	S	CU 2103	Raw milk	PLX
	S	CU 2101	Raw milk	CA
d	S	CU 2139	Side	CA
e	S	CU 2105	Raw milk	CA
f	S	CU 2138	Muzzle	CA
g	S	CU 2128	Handler	GC
h	S	CU 2106	Raw milk	CA
i	S	CU 2130	Bedding	YO
j	S	CU 2107	Raw milk	CA
k	S	CU 2118	Raw milk	YO

* CA; Chungang, WS; Woongsoo, SW; Sungwon, CY; Choya, JL; Joolim, YO; Yungoh, SGJ; Segongju, GC; Gunchun, CHK; Chyungyung, PLX; Pelix,
antichloramphnicol type R; resistant S; susceptible, Name of farm; given in bottom of Table 2.

c Type에 속하는 균주는 CU 2141, CU 2103 및 CU 2101등 3 균주이며, d Type부터 k Type까지는 각 1 균주로 나타났다. e Type은 CU 2105 1 균주이며, f Type에는 CU 2138 1 균주가 소속되었다.

모든 *Str. dysagalactiae* 균주는 pulsed field gel electrophoresis에 의하여 typing이 가능하였다. a Type은 3 목장의 원유, muzzle 및 개(dog)에서 분리되고 있어 환경으로부터 오염된 근거가 되고 있다.

22개의 분리균주는 그 절편의 수와 크기, 분포양상에서 고도의 이질성을 나타내었으며 그 유전적인 연관성이 80%를 기준으로 할 때 11개의 genotype으로 분류 가능하였다.

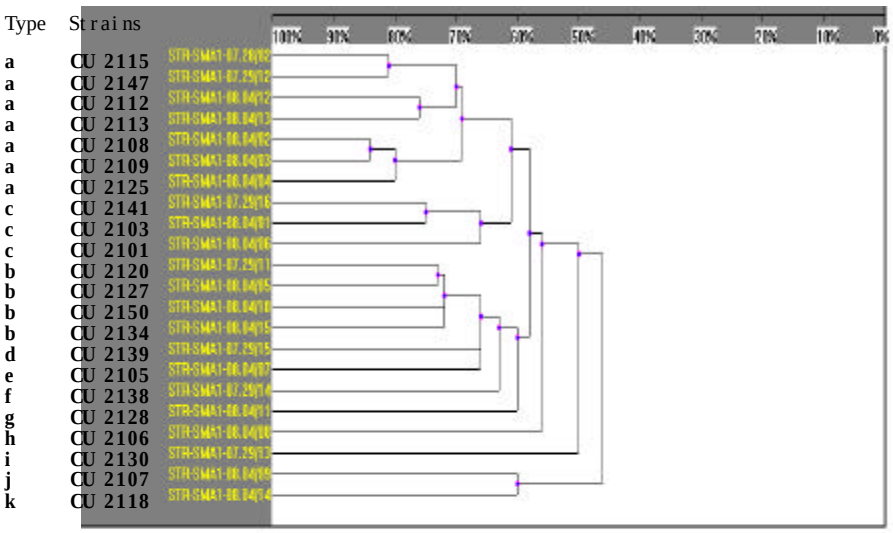


Fig. 9. Dendrogram and genotyping of *Str. dysagalctiae*

d Type에 속하는 균주는 CU 2115와 CU 2147의 2 균주이며 절편 수는 16이며 크기는 38kb에서 586kb였다. e Type에는 CU 2106와 CU 2118이 소속되며 7-9개의 절편이 생성되고 크기는 59kb에서 584kb 였으며, f Type에는 CU 2101과 CU 2128이 소속되며 15개의 절편이 생성되며 그 크기는 7kb로부터 542kb였으며 g, h 및 i Type은 각 1 균주가 소속되었다.

모든 *Str. dysagalactiae* 균주는 pulsed field gel electrophoresis에 의하여 typing이 가능하였다. 그 결과는 Table 5에서 제시된 바와 같고, a Type은 동일한 목장의 축사의 바닥과 원유에서 분리되고 있어 환경으로부터 오염된 오염원 확인의 근거가 되고 있다.

b Type의 분포를 보면 그 오염경로의 추적이 더욱 분명하게 되며 취

급자의 손에서 분리된 동일부류의 균주가 원유 중에서 분리되었고 c Type의 경우 비경에서 채취된 시료에 존재하는 균주가 원유 시료 중에 존재한다는 시험결과는 병원균의 오염경로에 대한 적절한 관리의 중요성을 제시해주고 있다. *Str. dysagalatiae*의 분포와 genotyping 결과는 Table 5에 제시되었다. 19개의 분리균주는 그 절편의 수와 크기분포양상에서 고도의 이질성을 나타내었으며 그 유전적인 연관성이 80%를 기준으로 할 때 9개의 genotype으로 분류 가능하였다. a Type은 2개의 subtype으로 구분할 수 있으며 b Type은 1개의 subtype으로 구분이 가능하였다. 특히 b Type의 CU 2128와 CU 2109은 d Type의 CU 2115와 CU 2147은 95% 상동성의 profile을 갖는 것으로 확인되었다.

다. 목장에서 우유 중으로 오염경로 추적

Table 1에서 제시한 바와 같이 *Staphylococcus aureus*의 type 별 분포상태 및 그 source를 참작하여 우유 생산환경에서 우유로 오염경로의 추정이 가능하다.

a Type의 경우 유우의 축사바닥과 체표면인 비경부위와 유두부위에 동일 type이 존재해 있을 뿐 아니라 착유기 내에서도 분리되고 원유 중에서도 분리되는 것을 근거로 하여 환경에서의 오염가능성을 보여주고 있다.

b Type의 분포상황을 보면 사료 목장에서 사육되는 개와 축사바닥에서 동일 균주가 발견되며 질 부위, 사료 및 원유에서 동일 type의 균주가 나타나고 있다.

c Type은 체표면 즉 직장, 질 및 비경 등과 원유에서 나타나고 있으며 d Type은 사육되는 개(dog)와 유우의 체표면, 비경, 유두 및 사료 등에서 존재하는 동일 type이 원유에도 존재하고 있음을 제시하고 있다.

*Str. uberis*의 경우 a Type은 동일한 목장의 사료, 직장 및 질에서 분리되고 있어 소의 체표면과 사료에서 분포되어있어 유두와 착유기 내부에서도 동일한 type이 발견되어 오염경로의 추정이 가능하다(Romeo 등, 1999: Cassandra와 Condemine, 1990: Louie 등, 1999).

b Type의 분포를 보면 그 오염경로의 추적이 더욱 분명하게 되며 질과 직장에서 분리된 시료에서 분리된 동일부류의 균주가 동일 목장의 원유 중에서 분리되어 소의 신체 중 일부에 존재하던 병원균이 우유에까지 오염될 수 있음을 보여 주었다. d Type의 경우 직장과 질에서 채취된 시료에 존재하는 균주가 유두와 착유기 내에서 채취된 시료 중에 존재한다

는 시험결과는 병원균의 오염경로에 대한 적절한 관리의 중요성을 제시해 주고 있다. 모든 *Str. dysagalactiae* 균주를 pulsed field gel electrophoresis에 의하여 typing이 가능한 결과 다음과 같이 오염가능성을 추정할 수 있다.

a Type은 동일한 목장의 축사의 바닥과 원유에서 분리되고 있어 환경으로부터 오염된 오염원확인의 근거가 되고있다(Cassandra 와 Condemine. 1990).

b Type의 분포를 보면 그 오염경로의 추적이 더욱 분명하게 되며 취급자의 손에서 분리된 동일부류의 균주가 원유 중에서 분리되었고 c Type의 경우 비경에서 채취된 시료에 존재하는 균주가 원유 시료 중에 존재한다는 시험결과는 병원균의 오염경로에 대한 적절한 관리의 중요성을 제시해 주고 있다. *Str. dysagalactiae*의 분포와 genotyping 결과는 Table 5에 제시되었다.

4. 결론

유방염의 원인균인 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus* spp.의 분리균주에 대한 동정과 typing을 위하여 genomic DNA의 PFGE 분석을 시행하였고 typing 결과에 따라 원유 중의 오염경로를 추적하였으며 genomic DNA의 특성을 구명하였다. PFGE 분석을 위한 genomic DNA 절편 생성을 위한 제한효소 로는 *Sma*I이 가장 적합한 것으로 분석되었고, 전기영동의 최적 pulse time은 5-40sec이고 전기영동 시간은 22시간이었다.

*Staph. aureus*의 genomic DNA는 2.0Mb에서 3.0Mb의 크기를 가지며 genome 구조는 매우 다양한 형태로 이루어 진 것으로 확인되었으며 *Streptococcus* spp.의 크기도 2.0-3.0 Mb의 크기를 나타내었다.

절편크기 분포에 따른 typing 결과 *Staphylococcus aureus*, *Str. uberis* 및 *Str. dysagalactiae*는 각각 19, 7 및 11개의 genotype으로 분류 가능하였다. Genotype의 목장환경과 우유 중의 분포상 고려하여 우유로의 오염경로 추적이 가능하였다.

제 3 절 *Staphylococcus aureus*와 Streptococci의 항생제 및 소독제에 대한 감수성

SUMMARY

Antibiotic and disinfectant susceptibility determination for mastitis causing strains of *Staph. aureus* and *Streptococcus* spp. was undertaken to get data for effective control of mastitis.

Staph. aureus was shown to be very susceptible against ampicillin-sulbactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, vancomycin and imipenem, in order. *Strep. dysagalactiae* was susceptible to ampicillin- sulbactam, imipenem and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Str. agalactiae* was highly susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, trimethoprim-sulfamethoxazole and mipenem *Strep. uberis* was highly susceptible to amoxicillin-clavulanic acid and ampicillin-sulbactam Germex, a quarternary ammonium compound was the most effective disinfectant against *Staph. aureus*. Betadin, an iodine compound was the highest effective against *Str. dysagalactiae* and *Str. agalactiae*. FarmfluidS was most effective disinfectant against *Str. uberis*. Minimal inhibitory concentration of chloramphenicol against *Staph. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. uberis* and *Str. dysagalactiae* revealed as 30ug/ml, 50ug/ml, 50ug/ml and >50ug/ml, respectively.

1. 서론

항생물질은 현재 유방염의 효과적인 치료에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있으나 유방염균의 내성 생성 때문에 사용 이전에 확인하여 그 감수성을 입증한 후 항생제를 투여 해야하는 필요성에 당면하였다. Owen과 Watts(1987)는 소의 유방에서 분리한 *Staph. aureus*에 대하여 disc diffusion 방법에 의한 항생물질 감수성 시험을 실시한 결과 가장 효과적인 항생물질은 novobiocin, streptomycin, gentamycin, tetracycline 및 vancomycin으로 보고한바 있다. *Staph. aureus*에 의한 준임상형 유방염

치료에 있어서 78개의 유구에 대한 임상 치료를 2구로 나누어 62.5mg의 amoxicillin을 함유한 제재로 유두에 6회 동안 착유 이후에 주입하는 방법으로 치료하고 다른 group은 위의 유두내 주입 치료를 동일하게 실시하는 것과 더불어 9,000,000 U의 penicillin G를 3일간 근육 내 주사 방법을 실시한 결과 세균학적인 치유 율은 전자는 30.4%를 나타내었으나 유방 내 주입과 근육 내 항생제 주사 방법을 같이 사용한 시험구에서는 48%의 치유율을 나타낸 것으로 보고되었다(Owens 등, 1988, Fred 와 Nancy 1996).

Penicillin 등의 항균제가 임상에 응용되기 시작하던 초기에는 *Staph. aureus* 감염증이 용이하게 치유되었으나 penicillin 등을 비롯한 상용 항균제에 노출이 빈번해 짐에 따라 약제 내성균의 출현 빈도는 점차 증가하는 추세인데, 이는 penicillin G 내성은 β-lactamase 생성 때문이며, 이들에 의해서 분해되지 않은 반합성 penicillin인 methicillin 내성균의 분리 빈도는 1970년대 후반부터 급격히 증가하였으며, 병원 외 감염에서도 분리가 되었다고 보고된바 있다(Kang, 1993: Dunsmore 와 Nuzum, 1977: Everhart 등, 1983).

Methicillin 저항성 실험으로서 *Staph. epidermidis* 와 *Staph. aureus* 가 일반적으로 가장 많이 사용되고 있으며 *Staph. aureus* 의 경우 균주 종류, 접종시 균주의 양, 온도, 배양 시간 및 배지 성분에 들어 있는 salt의 함량이 결과에 많은 영향을 미친다(Göran 등, 1991: Larry, 1981).

본 연구에서는 목장에서 분리된 유방염 원인균 *Staphylococcus aureus* 와 *Streptococcus* spp. 의 1) 항생제와 소독제에 대한 내성을 조사하여 목장에서 당면하고 있는 균주의 항생제 감수성 에 대한 현황 파악과 이에 대한 정확한 치료에 이용할 수 있는 감수성 data를 확보하여 치료에 이용하며 2) 목장에서 선발된 균주에 대한 살균효과가 가장 우수하고 그 경제성이 있는 소독제 선정의 기초자료를 확보함은 물론 3) 선별된 균주에 대한 최소억제농도에 관한 정보와 항생제 내성인자의 분포상황을 분자생물학적 방법에 의하여 측정하기 위하여 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 유방염 균주에 대한 항생제 감수성 측정

1) 시료 채취

안성시 근교에 있는 9개의 목장에서 유방염에 감염된 유우에서 착유한

우유시료 및 주변 환경에서 시료를 채취하여 분리 동정하였으며, 서울대학교 수의대 미생물 연구실에서 17종의 유방염 표준균주를 분양 받았다.

2) 사용 배지

항생제와 소독제 test에 사용된 Brain heart infusion(BHI, 121℃, 15분간 멸균)과, Mueller-Hinton agar(MHA, 121℃, 15분간 멸균)를 각각 액체 배지와 고체 배지로 사용하였다.

3) 배지 제조

각각의 유방염 균주를 plate에 접종하기 위해서 McFarland 0.5 turbidity standard에 맞춘다. 이때 균주를 완전히 살포하기 위해서 plate를 약 60° 정도로 회전시키면서 멸균된 면봉으로 agar plate 표면에 문지른다. 이때 plate에 열이 발생되는 것과 연한 물이 생성되는 것을 조심해야 하며, plate에 균주를 분주한 뒤 약 3-15분 뒤에 disk를 plate에 올려놓는다.

4) 항생제 감수성 검사

멸균된 핀셋으로 agar 표면에 disk를 올려 넣은 뒤, 핀셋으로 agar 표면에 접착되도록 누른다. 이때 각각의 disk는 중심부로부터 거리가 24mm 이상 떨어지게 해야 하며, disk가 agar 표면에 붙으면 이동 시켜서는 안된다. 150㎜ plate 경우는 12개 이상의 disk를 놓아야 하고, disk가 plate에 놓여지면 15분 내에 배양기(37℃, 16h)에 넣는다. 균주가 plate 상에서 고루 자란 뒤 그림자가 비취지 않도록 검은 종이를 대고 45° 각도에서 빛을 비추인 뒤 억제환의 직경을 측정한다.

5) 항생제 종류

항생제 종류는 Table 1에 표시했다.

나 최소 억제 농도 (MIC) 측정

Chloramphenicol의 *Staph. aureus*와 *Streptococcus* spp. 12 균주에 대한 MIC 측정은 Biosceen C를 사용하여 측정하였다. Chloramphenicol을 각각 50㎍/㎖, 30㎍/㎖ 및 15㎍/㎖의 농도로 희석한 후 37℃에서 16h동안 배양하며 생장곡선 작성을 위한 흡광도의 기록시간 간격은 20분으로 하였고, 균접종 10㎕, 항생제 30㎕ 및 broth 310㎕을 첨가하여 전체량은

350㎕으로 맞추었으며 기록된 흡광도 치를 기준으로 하여 생장곡선을 작성하였다.

다. 유방염 균주에 대한 소독제 실험

1) 배지 제조

항생제 실험과 동일하게 Brain heart infusion(BHI, 121℃, 15분간 멸균)과, Mueller-Hinton agar(MHA, 121℃, 15분간 멸균)를 각각 액체 배지와 고체 배지로 사용하였고, 균주의 혼탁도를 McFarland 0.5 turbidity standard에 맞춘 뒤, plate에 균주를 항생제 실험과 동일하게 도말했다.

2) 소독제 감수성 검사

여러 소독제를 구입하여 본 실험에 들어가기 전 사용 목적에 맞게 희석을 한다. 희석 비율은 다음과 같다. 콜타르 유도체합재인 Longlife250S(바이엘 코리아)는 1:250, FarmfluidS(바이엘코리아)는 1:500로 희석하고, 4급 암모늄제인 Germex(바이엘코리아)는 1:1000배 희석, 요오드제인 Betadin은 1:10배로 희석한다. 페놀류 계통인 Danzol(현대약품공업)은 1:100배로 희석한다. 희석이 된 소독제를 30㎕씩 disk에 넣는다(Sheldrake 와 Hoare 1982).

3) 사용 균주 및 소독제 종류

소독제 실험에 사용된 균주는 제1절 Table 4에 제시되었고, 소독제의 종류는 Table 2에 표시하였다.

Table 1. Zone diameter interpretation standards for staphylococci and streptococci

Antimicrobial agent	Disk content	Zone diam(mm)			
		Resistant	intermediate	Moderately susceptible	Susceptible
Amikacin	30μg	≤ 14	15-16		≥ 17
Amoxicillin-clavulanic acid	20/10μg	≤ 19			≥ 20
Ampicillin	10μg	≤ 28			≥ 29
Ampicillin-sulbactam	10/10μg	≤ 11		12-14	≥ 15
Cefazolin	30μg	≤ 14	15-17		≥ 18
Cefotaxime	30μg	≤ 14		15-22	≥ 23
Ceftriaxone	30μg	≤ 13		14-20	≥ 21
Cephalothin	30μg	≤ 14		15-17	≥ 18
Chloramphenicol	30μg	≤ 12	13-17		≥ 18
Ciprofloxacin	5μg	≤ 15		16-20	≥ 21
Clindamycin	2μg	≤ 14	15-20		≥ 21
Erythromycin	15μg	≤ 13	14-22		≥ 23
Gentamicin	10μg	≤ 12	13-14		≥ 15
Imipenem	10μg	≤ 13		14-15	≥ 16
Oxacillin	1μg	≤ 10	11-12		≥ 13
Penicillin	10 U	≤ 28			≥ 29
Tetracycline	30μg	≤ 14	15-18		≥ 19
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75μg	≤ 10		11-15	≥ 16
Vancomycin	30μg	≤ 9	10-11		≥ 12

Table 2. List of disinfectants

약제	상품명	용도 (희석비율)	작용
콜타르유도체합제	Longlife250S (바이엘 코리아)	축사외부 소독(1:250)	축사주변의 기생충란, 바이러스에 효과.
콜타르유도체합제	FarmfluidS (바이엘코리아)	축사외부 소독(1:500)	축사주변의 기생충란, 바이러스에 효과.
4급 암모늄제	Germex (바이엘코리아)	낙농기구 및 유방소독(1:1000)	세균, 곰팡이류에 효과적
요오드제	Betadin (바이엘코리아)	유방소독 (1:10)	살충, 살균작용우수
페놀류	Danzol (현대약품공업)	축사소독 (1:100)	살충, 살균작용우수

3 결과 및 고찰

가. 항생제에 대한 감수성

1) *Str. uberis*의 항생제 감수성

Table 3에서는 18 균주의 *Str. uberis*가 항생제 19종에 대한 감수성 시험 결과를 제시하였다. 표기된 약어 중 R은 저항성을 나타낸 경우이고 S는 감수성을 보인 균주를 지시하며 M은 중간 정도의 감수성 혹은 저항성을 보인 경우이다.

Chloramphenicol에 대한 감수성을 중심으로 하여 저항성 pattern을 요약한 결과가 Table 4에 제시되었다. 18 균주 중 3 균주(18%)는 고도의 chloramphenicol 감수성이 저하된 상태를 나타내었고 genotype은 c와 d 형에 속한 균주이다. CRSU 균주의 66.6%는 amicasin과 ampicillin에 대하여 감수성이 저하된 상태로 나타났다. CRSU 균주의 33.3%는 cefotaxim과 ceftriaxone, erythromycin, trimethoprim-sulfamethoxazol 및 vancomycin에 대하여 감수성이 저하된 상태로 나타났다. 모든 CRSU 균주(100%)는 clindamycin, oxacillin, penicillin 및 tetracycline에 대하여 감수성이 저하된 상태를 나타내었다.

Table 3. Susceptibility of *Streptococcus uberis* against antimicrobial agents

R; resistant M; moderately susceptible S; susceptible

type	isolate No.	Antimicrobial agent																		
		AN30	AmC30	AM10	SAM20	CZ30	CTX30	CRO30	CF30	C30	CIP5	CC2	E15	GM10	IPM10	OX1	P10	Te30	SXT	Va30
	2123	M	S	R	S	R	S	M	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S
	2131	S	S	R	M	R	S	S	R	S	S	R	M	S	S	R	R	R	S	R
a	2137	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	M	M	M	S	R	R	S	S	S
	2140	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	M	S	S	R	R	R	S	R
	2148	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
	2116	S	S	R	S	S	S	S	M	S	S	R	M	S	S	R	R	S	S	R
b	2143	M	S	R	S	M	M	M	R	S	M	R	M	S	S	R	R	S	S	S
	2145	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	R	M	R	S	R	R	S	S	S
	2142	S	S	R	S	M	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R
c	2144	R	S	R	S	M	R	R	M	R	M	R	R	M	S	R	R	R	S	S
	2135	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S
	2136	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	M	S	S	R	R	R	R	R
d	2146	R	S	M	S	M	M	M	M	R	M	R	M	M	S	R	R	R	S	S
	2149	M	S	S	S	M	M	M	S	S	S	M	M	S	S	R	R	M	S	S
	2124	R	S	S	S	M	R	R	M	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
e	2133	R	S	S	S	S	M	M	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S
f	2101	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	M	S	S	R	R	R	S	S
g	2121	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	M	M	M	S	R	R	S	S	S

Table 4. Antimicrobial susceptibilities of chloramphenicol resistant and susceptible *Str. uberis*

Antimicrobial agent	Resistant isolates (%)	
	CSSU*	CRSU*
Chloramphenicol	0	100
Amicasin	46.6	66.6
Amoxillin	6.7	0
Ampicillin	73.3	66.6
Ampicillin-sublactam	0	0
Cefazolin	46.6	0
Cefotaxime	40.0	33.3
Ceftriaxone	40.0	33.3
Cefalothin	66.6	0
Ciprofloxacin	6.6	0
Clindamycin	80.0	100
Erythromycin	20.0	33.3
Gentamycin	20.0	0
Imipenem	0	0
Oxacillin	100	100
Penicillin	100	100
Tetracycline	53.3	100
Trimethoprim-sulfamethoxazol	0	33.3
Vancomycin	33.3	33.3

* CSSU; chloramphenicol susceptible *Str. uberis*
CRSU; chloramphenicol resistant *Str. uberis*

CSSU 균주들은 ampicillin-sublactam, imipenem 및 trimethoprim-sulfamethoxazol에도 고도의 민감도를 나타내었다. Oxacillin, penicillin 및 clindamycin에 대한 저항성은 CSSU 균주 및 CRSU 균주에 공통적으로 강한 저항성을 나타내었다 CSSU 균주의 6.6%는 ciprofloxacin과 amoxillin에 대하여 저하된 민감도를 나타내었고, 20%는 gentamycin과 erythromycin에 대한 저항성을 나타내었으며, CSSU 균주의 30-40%는 ceftriaxone, cefotaxime, cefazolin, amicasin 및 vancomycin에 대하여

저항성을 나타내었다.

동일한 profile을 갖는 영오목장 유우의 질에서 유래된 CU 2146과 동일목장에서 사육되는 유우의 질에서 분리된 CU2149간의 chloramphenicol 감수성의 차이를 보일 뿐 아니라 chloramphenicol, amicasin, cylindamycin, oxacillin penicillin 및 tetracycline 등 6개 항생제에 대한 저항성을 가지나 CU2149 은 oxacillin과 penicillin 2개의 항생제에 대하여만 저항성을 나타내는 차이를 보이고 있다.

중요한 항생제인 methicillin과 vancomycin에 대한 저항성은 저항성 유전자에 의한 것으로 알려져 있다. *S. aureus*에서 methicillin 저항성은 *mecA* 유전자의 명령에 의하여 생산된 penicillin 결합단백질이 생산됨으로 기인하여 나타나게 된다. 따라서 methicillin 저항성을 확인하기 위하여는 *mecA* 유전자를 검색해 내는 것을 그 중요한 기준으로 삼고있다 (Willet 등, 1996).

*S. aureus*에서 *mecA* 검색에서 양성으로 나타난 경우에는 vancomycin을 효과적으로 이용할 수 있다. 따라서 *mecA* 유전자를 신속히 검색하여 vancomycin의 과용을 억제할 수 있다. Table 4에 제시된바와 같이 vancomycin 저항성을 획득한 균주는 27.8 %로 나타났으며 저항성은 vancomycin 저항성 유전자에 기인되며 장내구균에 널리 분포되어 있으며 streptococci에도 존재하는 것으로 확인된바 있다(Poyart 등, 1997). 3가지 유전자 *vanA*, *vanB* 및 *vanC*가 vancomycin 저항성을 결정하며 van 유전자의 검색방법도 고안되었다(Gold 와 Moellering 1996)

2) *Str. dysagalactiae*의 항생제 감수성

*Str. dysagalactiae*의 균주 별 항생제 감수성 결과는 Table 5에서 제시되었다. 22 균주 중 2 균주(9.1%)는 고도의 chloramphenicol 감수성이 저하된 상태를 나타내었고 genotype a와 b 형에 속한 균주이다. Table 6에는 22 균주가 나타내는 19 종에 대한 항생제에 대한 감수성시험 결과를 요약하였다. CRSD 균주의 100%는 oxacillin과 penicillin에 대하여 감수성이 저하된 상태이고 91.0%는 ampicillin과 clindamycin에 대하여 감수성이 저하되었으며 100%는 imipenem과 trimethoprim-sulfamethoxazol에 대하여는 저항성을 전혀 나타내지 아니하였다.

CSSD 균주들은 amoxillin, ampicillin-sublactam 및 ciprofloxacin에 고도의 민감도를 나타내었다(Table 6). oxacillin, penicillin 및 clindamycin에 대한 저항성은 CSSD 균주 및 CRSD 균주에 공통적으로 강

한 저항성을 나타내었다. CSSD의 23%는 vancomycin에 대한 저항성을 나타내었다.

Table 5. Susceptibility of *Streptococcus dysagalactiae* against antimicrobial agents

Type	Isolate No.	Antimicrobial agent																	
		AN30	AmC30	AM10	SAM20	CZ30	CTX30	CRO30	CF30	C30	CIP5	CC2	E15	GM10	IPM10	OX1	P10	Te30	SXT	Va30
	2115	R	S	S	S	M	M	R	M	S	S	R	M	R	S	R	R	R	S	S
	2147	S	R	R	S	R	S	S	R	M	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R
	2112	R	S	R	S	R	R	R	M	S	S	R	M	R	S	R	R	S	S	S
a	2113	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	M	S	R	S	R	R	S	S	S
	2108	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
	2109	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
	2125	R	S	R	S	R	R	R	M	S	S	R	M	R	S	R	R	R	S	S
	2120	S	S	R	S	S	S	S	R	M	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R
b	2127	M	S	R	S	R	R	R	M	S	S	R	M	R	S	R	R	R	S	S
	2150	S	M	R	S	S	S	S	M	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R
	2134	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R
	2141	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	R	S	R	S	R	R	R	S	S
c	2103	R	S	R	S	M	R	R	M	S	S	R	M	R	S	R	R	R	S	S
	2101	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	M	S	S	R	R	R	S	S
d	2139	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	M	S	S	R	R	S	S	R
e	2105	S	M	R	S	S	S	S	R	S	S	R	M	S	S	R	R	S	S	S
f	2138	R	S	S	S	M	R	R	S	S	S	S	S	M	S	R	R	S	S	S
g	2128	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	M	R	S	R	R	R	S	S
h	2106	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	R	M	R	S	R	R	R	S	S
i	2130	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
j	2107	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	M	S	S	R	R	S	S	R
k	2118	S	S	R	M	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S

Table 6. Antimicrobial susceptibilities of chloramphenicol resistant and susceptible *Str. dysagalctiae*

Antimicrobial agent	Resistant isolates (%)	
	CSSD*	CRSD*
Chloramphenicol	0	100
Amicasin	50.0	0
Amoxillin	5.0	0
Ampicillin	90.0	100
Ampicillin-sublactam	5.0	0
Cefazolin	60.0	0
Cefotaxime	65.0	0
Ceftriaxone	55.0	0
Cefalothin	50.0	0
Ciprofloxacin	5.0	0
Clindamycin	90.0	100
Erythromycin	25.0	100
Gentamycin	50.0	0
Imipenem	0	0
Oxacillin	100	100
Penicillin	100	100
Tetracycline	60.0	100
Trimethoprim-sulfamethoxazol	0	0
Vancomycin	30.0	0

* CSSD; chloramphenicol susceptible *Str. dysagalctiae*

CRSD; chloramphenicol resistant *Str. dysagalctiae*

3) *Staphylococcus aureus* 및 *Streptococcus* spp.의 penicillin계 항생물질에 대한 감수성

*Staph. aurues*의 항생제에 대한 감수성은 Table 7에서 제시되어 있다. Table 8에서는 *Staph. aureus*에 대한 penicillin계통의 항생제 감수성 정도를 나타냈는데, amoxicillin-clavulanic의 경우, *Staph. aureus* 19 type 중 19 type 모두 100% 감수성을 나타냈으며, ampicillin-sulbactam과 vancomycin에서도 19 type 전부 100%의 감수성을 보였다. Oxacillin과 penicillin은 모든 genotype에서 감수성을 전혀 보이지 않았다.

Table 7. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial agents

Type	Isolate No.	Antimicrobial agent																	
		AN30	AmC30	AM10	SAM20	CZ30	CTX30	CRO30	CF30	C30	CIP5	CC2	E15	GM10	IPM10	OX1	P10	Te30	SXT	Va30
a	1110	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	R	R	R	M	R	R	R	S	S
	1158	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	R	M	S	S	R	R	R	S	S
	1159	R	S	R	S	M	R	R	R	S	M	R	M	S	S	R	R	R	S	S
	1115	R	S	R	S	M	R	R	R	S	M	R	R	R	S	R	R	R	S	S
	1190	R	S	R	S	M	R	R	M	S	M	R	M	M	S	R	R	R	S	S
	1157	R	S	R	S	M	R	R	M	S	S	R	M	M	S	R	R	R	S	S
	1136	R	S	R	S	M	R	R	M	S	S	R	S	M	S	R	R	S	S	S
	1189	R	S	S	S	M	R	R	M	S	M	R	S	M	S	R	R	R	S	S
	1150	R	S	R	S	M	R	R	R	S	M	R	M	M	S	R	R	S	S	S
	1133	R	S	R	S	M	R	R	M	S	S	R	M	M	S	R	R	R	S	S
	1116	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	R	M	M	S	R	R	R	S	S
	1138	R	S	R	S	M	R	R	M	S	M	R	M	M	S	R	R	R	S	S
	1137	R	S	R	S	M	R	R	R	S	M	R	M	M	S	R	R	S	S	S
	1120	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	R	M	M	S	R	R	S	S	S
	1188	R	S	R	S	S	R	R	M	S	M	R	M	M	S	R	R	R	S	S
b	1107	R	S	M	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
	1140	R	S	S	S	M	R	R	R	S	M	R	M	M	S	R	R	S	S	S
	1192	R	S	R	S	R	R	R	R	R	M	R	R	S	S	R	R	R	S	S
	1144	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	M	S	R	R	S	S	S
	1121	R	S	M	S	M	R	R	R	S	S	R	S	M	S	R	R	R	S	S
c	1174	R	S	R	S	R	R	R	M	S	S	S	S	M	S	R	R	R	S	S
	1170	R	S	M	S	S	R	R	M	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
	1172	R	S	R	S	S	R	R	R	R	M	R	R	S	S	R	R	R	S	S

Type	isolate No.	Antimicrobial agent																		
		AN30	AmC30	AM10	SAM20	CZ30	CTX30	CRO30	CF30	C30	CIP5	CC2	E15	GM10	IPM0	OX1	P10	Te30	SXT	Va30
d	1119	S	S	M	S	M	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S
	1165	R	S	M	S	M	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
	1167	R	S	M	S	M	R	R	M	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
	1166	R	S	M	S	M	R	R	M	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
e	1176	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	S	M	S	S	R	R	R	S	S
	1152	S	S	R	S	S	R	S	S	R	M	R	M	M	S	R	R	S	S	S
	1173	R	S	S	S	S	M	M	S	S	S	R	M	S	S	R	R	S	S	S
f	1191	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	M	S	S
	1164	R	S	S	S	M	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
	1175	R	S	S	S	S	R	R	S	R	M	R	R	R	S	R	R	R	S	S
g	1160	R	S	R	S	R	R	R	R	M	M	S	M	R	S	R	R	R	S	S
	1143	R	S	M	S	S	R	R	S	S	S	R	M	S	S	R	R	R	S	S
h	1142	R	S	R	S	R	R	R	R	M	M	R	M	R	S	R	R	R	R	S
	1182	R	S	S	S	M	R	R	M	S	M	R	S	S	S	R	R	R	S	S
	1154	R	S	S	S	M	R	R	R	R	M	R	R	R	S	R	R	R	S	S
i	1101	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	R	M	R	S	R	R	S	S	S
j	1118	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	R	R	M	M	R	R	R	S	S
k	1139	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
l	1155	R	S	R	S	R	R	R	R	S	M	R	R	S	M	R	R	R	S	S
m	1134	R	S	R	S	M	R	R	M	S	M	R	M	M	S	R	R	R	S	S
n	1109	R	S	R	S	M	R	R	R	S	M	R	S	R	S	R	R	R	S	S
p	1114	R	S	S	S	M	S	S	S	S	M	S	R	S	R	R	R	R	R	S
r	1124	S	M	R	S	S	S	S	M	S	S	R	M	S	S	R	R	S	S	M
s	1135	R	S	R	S	R	R	R	R	M	M	R	R	M	S	R	R	R	S	S

Table 8. Susceptibility of *Staph. aureus* against penicillins

Penicillins	Types of *Staphylococcus aureus*						Susceptible strains from total	%
	a	b	c	d	e	Others		
Amoxicillin-clavulanic acid	15/15	4/4	4/4	4/4	3/3	17/17	47/47	100
Ampicillin	1/15	2/4	2/4	4/4	1/3	6/17	16/47	34
Ampicillin-sulbactam	15/15	4/4	4/4	4/4	3/3	17/17	47/47	100
Oxacillin	0/15	0/4	0/4	0/4	0/3	0/17	0/47	0
Penicillin	0/15	0/4	0/4	0/4	0/3	0/17	0/47	0
Group %[a]	80	80	80	100	80	80		

Group %[a] : group % of all susceptible and all resistant

Table 9. Susceptibility of *Streptococcus* spp. against penicillins

Penicillins	22 Strains of *Str. dysagalactiae*		7 Strains of *Str. agalactiae*		20 Strains of *Str. uberis*	
	Susceptible	%	Susceptible	%	Susceptible	%
Amoxicillin-clavulanic acid	19/22	86	7/7	100	19/20	95
Ampicillin	2/22	9	1/7	14	4/20	20
Ampicillin-sulbactam	20/22	90	6/7	86	19/20	95
Oxacillin	0/22	0	0/7	0	0/20	0
Penicillin	1/22	5	1/7	14	0/20	0

Fig. 1에서는 *Staph. aureus*와 *Streptococcus* spp.의 penicillin계열 항생물질에 대한 감수성 시험결과를 종합한 것이다.

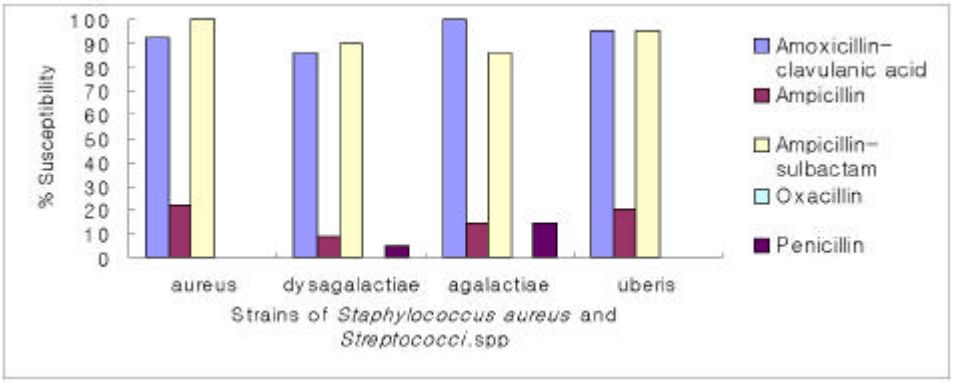


Fig. 1. Susceptibility of *Staph. aureus* and *Streptococcus* spp. against penicillins

4) Cephalosporins 및 aminoglycosides 계통에 대한 감수성

Table 10에서는 *Staph. aureus*에 대한 cephalosporins 계통의 항생제 감수성 정도를 나타냈는데, cefazolin의 경우 *Staph. aureus* 19 type에 대하여 66% 정도의 감수성을 보였고, Cefotaxime은 e, f, p 및 r Type를 제외한 나머지 5 type에 대해서는 전혀 감수성을 보이지 않았다. cephalothin의 경우도 b Type에는 전혀 감수성을 보이지 않았지만, 전체적으로 볼 때 42.5%의 감수성만 보였다. 따라서 *Staph. aureus*는 전반적인 저항성을 나타내는 것으로 판단된다.

Table 11에서는 *Streptococcus* spp.의 cephalosporins 계통의 항생제에 대한 감수성 정도를 표시했다. Cephalosporins 계통의 항생제인 cefazolin, cefotaxime 및 cephalothin은 *Str. agalactiae*에서 각각 57% 정도의 감수성을 나타냈고, Cefotaxime은 *Str. uberis*에서 50% 정도의 감수성을 보였을 뿐, 전반적으로 40% 이하의 낮은 감수성을 보였으며, 공시된 2개의 genus 차이에 따른 항생제 감수성의 차이가 확인되었다.

Fig. 2에서는 *Staph. aureus*와 *Streptococcus* spp.의 cephalosporins 계통의 항생제에 대한 감수성 정도를 나타냈다. *Staph. aureus*의 경우, cephalosporins 계통의 항생제가 각각의 균주 type에 대하여 감수성이 20% 미만임으로 적합하지 않은 항생제 group이라고 판단할 수 있다.

Streptococcus spp.의 경우도 Fig. 2에서 나타나듯이 cephalosporins 계통의 항생제가 *Str. agalactiae*에만 57% 감수성을 보였을 뿐 전반적으로 40% 이하의 감수성을 보여 적합하지 않은 항생제 group이라고 판단할 수 있다.

Genome type과 cephalosporins 계 항생제에 대한 감수성과 연관성은 b형과 d형은 66% 수준으로 나타냈고 a와 c형은 33% 수준으로 genome type에 따른 항생제 감수성이 동일하게 나타났다. 이는 종에 따라 항생제 저항 유전자의 존재 부위가 plasmid transposon 혹은 염색체 DNA에 존재 가능성이 있다라는 원리와 부합되는 결과로 보인다(Jung, 1993).

Table 10. Susceptibility of *Staph. aureus* against cephalosporins and related antibiotics

Cephalosporins and related antibiotics	Types of *Staphylococcus aureus*						Susceptible strains	%
	a	b	c	d	e	Others		
Cefazolin	11/15	1/4	3/4	4/4	2/3	9/17	30/47	63.8
Cefotaxime	0/15	0/4	0/4	0/4	1/3	3/17	4/47	8.5
Cephalothin	7/15	0/4	2/4	3/4	2/3	6/17	20/47	42.5
Group %[a]	33	66	33	66	0	0		

Group %[a] : group % of all susceptible and all resistant

Table 11. Susceptibility of *Streptococcus* spp. against Cephalosporins and related antibiotics

Cephalosporins and related antibiotics	22 Strains of *Str. dysagalactiae*		7 Strains of *Str. agalactiae*		20 Strains of *Str. uberis*	
	Susceptible	%	Susceptible	%	Susceptible	%
Cefazolin	7/22	32	4/7	57	8/20	40
Cefotaxime	8/22	36	4/7	57	10/20	50
Cephalothin	6/22	27	4/7	57	6/20	30

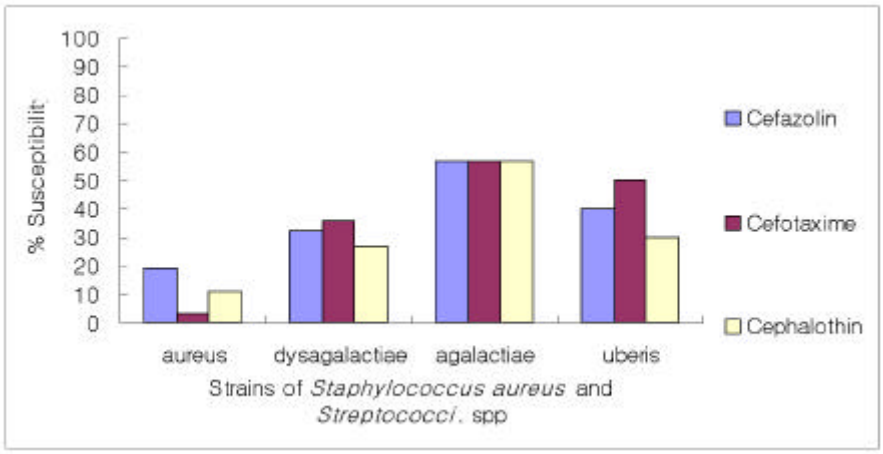


Fig. 2. Susceptibility of *Staph. aureus* and *Streptococcus* spp. against cephalosporins and related antibiotics

Table 12에서는 *Staph. aureus*에 대한 aminoglycosides 계통의 항생제 감수성 정도를 나타냈는데, amikacin의 경우 a, b 및 c Type에서 감수성이 전혀 나타나지 않았고 전체적으로 8.5% 감수성을 보인 반면, gentamicin의 경우에 있어서는 각 type에서 고르게 80.8%의 높은 감수성을 나타냈다.

Table 13에서는 *Streptococcus* spp.에 대한 aminoglycosides 계통의 항생제에 대한 감수성 정도를 표시했다. Aminoglycosides 계통의 항생제인 amikacin의 경우 *Str. dysagalactiae*에는 50%의 감수성을 나타냈으며, *Str. agalactiae*은 43%의 감수성을 보였고, *Str. uberis*는 amikacin이 45%를 나타냈다. Gentamicin은 *Str. dysagalatiae*에는 50%의 감수성을 나타냈으며, *Str. agalactiae*은 43%의 감수성을 보였고, *Str. uberis*는 65%의 감수성을 보여 aminoglycosides 계통의 항생제 중에서는 gentamicin이 높은편이다.

Fig. 3에서는 *Staph. aureus*와 *Streptococcus* spp.의 aminoglycosides 계통의 항생제에 대한 감수성 정도를 표시했다. *Staph. aureus*의 경우 aminoglycosides 계통의 항생제인 amikacin은 감수성이 8%로서 항생제로는 부적합하다고 판단할 수 있으며 gentamicin도 40%로서 감수성이 낮은 편이지만 c와 d Type의 경우에는 감수성이 높은 편이다.

Table 12. Susceptibility of *Staph. aureus* against aminoglycosides

Aminoglycosides	Types of *Staphylococcus aureus*						Susceptible strains from total	%
	a	b	c	d	e	Others		
Amikacin	0/15	0/4	0/4	1/4	1/3	2/17	4/47	8.5
Gentamicin	13/15	4/4	4/4	4/4	0/3	10/17	38/47	80.8
Group %[a]	50	100	50	100	50	0		

Group %[a] : group % of all susceptible and all resistant

Table 13. Susceptibility of *Streptococcus* spp. against aminoglycosides

Aminoglycosides	22 Strains of *Str. dysagalatiae*		7 Strains of *Str. agalatiae*		20 Strains of *Str. uberis*	
	Susceptible	%	Susceptible	%	Susceptible	%
Amikacin	11/22	50	3/7	43	9/20	45
Gentamicin	11/22	50	3/7	43	13/20	65

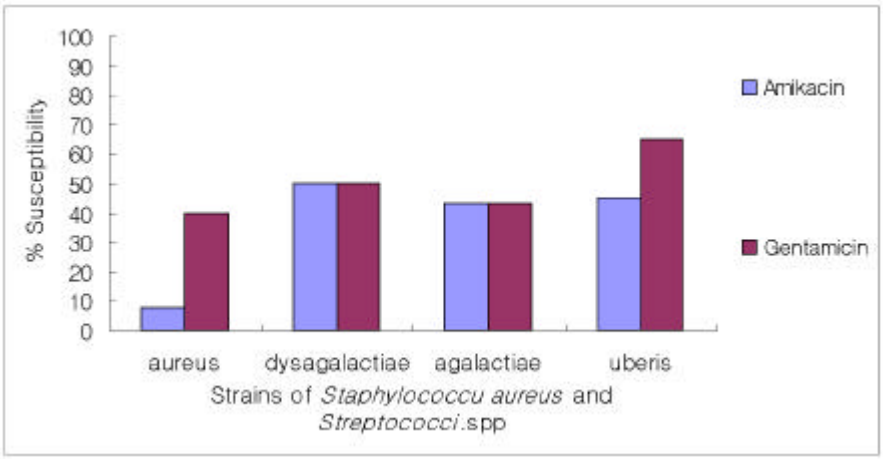


Fig. 3. Susceptibility of *Staph. aureus* and *Streptococcus* spp. against aminoglycosides

6) Tetracycline 계 항생제 감수성

Table 14에서는 *Staph. aureus*에 대한 tetracyclines의 감수성 정도를 나타냈는데, ceftriaxone는 a, b, c 및 d Type에 전혀 감수성이 나타나지 않았고, Chloramphenicol은 a Type에는 100%의 감수성을 보였고, chloramphenicol의 경우 strain에 따라서 감수성의 차이가 심하다는 것을 알 수 있다. ciprofloxacin은 k Type의 경우를 빼고, 100%로서 감수성이 높게 나타났다. Imipenem의 경우 a, b, c, d 및 e Type에 100%의 감수성을 보였다. tetracycline은 c type에 전혀 감수성이 나타나지 않았고, trimethoprim-sulfamethoxazol은 a, b, c, d 및 e Type에 100%의 감수성을 보였다. Clindamycin의 경우 a, b 및 d Type에서 감수성이 전혀 나타나지 않았고, erythromycin은 d Type에서 감수성이 전혀 나타나지 않았다. 하지만, vancomycin의 경우는 *Staph. aureus* 19 type에 대하여 100% 감수성을 보여 심한 대조를 보이고 있다.

Table 15에서는 *Streptococcus* spp.에 대하여 tetracyclines에 대한 감수성 정도를 표시했다. Ceftriaxone이 *Str. dysagalactiae*와 *Str. agalactiae* 및 *Str. uberis*에 각각 50%, 57% 및 45%의 감수성을 보였고, chloramphenicol은 각각 82%, 71% 및 85%의 아주 높은 감수성을 보였다. Ciprofloxacin은 *Str. dysagalactiae*, *Str. agalactiae* 및 *Str. uberis*에 각각 86%, 57% 및 80%의 감수성을 보여 각 균주별로 감수성의 차이가 큰 것을 알 수 있으며, imipenem의 경우는 각각 95%, 86% 및 100%의 감수성을 보여, *Streptococcus* spp. 계열의 균주에 대해서 적합한 항생제라고 판단할 수 있다. 반면, tetracycline은 *Str. dysagalactiae*, *Str. agalactiae* 및 *Str. uberis*에 각각 36%, 43% 및 50%의 낮은 감수성을 보여, tetracycline이 *Streptococcus* spp. 계열의 균주에 대해서는 항생작용 능력이 매우 떨어짐을 알 수 있으며, Trimethoprim-sulfamethoxazol은 각각 100%, 86% 및 95%의 감수성을 보여 imipenem과 함께 *Streptococcus* spp. 계열의 균주에 대해서 가장 적합한 항생제라고 판단할 수 있으며, clindamycin과 erythromycin은 각각의 균주에 대하여 20% 이하의 감수성을 보였고, vancomycin은 각각의 *Streptococcus* spp. 계열의 균주에 대해서 70% 정도의 감수성을 나타내었다.

Fig. 4에서는 *Staph. aureus*와 *Streptococcus* spp.의 tetracyclines에 대한 감수성 정도를 나타냈다. *Staph. aureus*의 경우 imipenem에 대해 a, b, c, d 및 h Type에 100%의 감수성을 보여 전체적으로 95%의 높은 감수성을 보였고, trimethoprim-sulfamethoxazol도 a, b, c, d 및 h Type에 100%의 감수성을 보여 전체적으로 97%의 높은 감수성을 보여 *Staph. aureus*에 대하여 적합한 항생제라고 할 수 있으며, 특히 vancomycin이

Staph. aureus 6 type에 대해서 모두 100%의 감수성을 보여 가장 높은 감수성을 보인 반면, clindamycin 과 erythromycin은 각각 5%와 14%의 감수성을 보여 적합하지 않은 항생제라 판단된다. *Streptococcus* spp.의 경우, imipenem과 trimethoprim-sulfamethoxazol이 각각의 균주에 대하여 85% 이상의 높은 감수성을 보여 적합한 항생제라고 판단되며, 그 외 vancomycin이 각각의 *Streptococcus* spp. 균주에 대하여 65% 정도의 감수성을 보였고 clindamycin과 erythromycin은 20% 미만의 감수성을 나타내었다.

Table 14. Susceptibility of *Staph. aureus* against tetracycline antibiotics

Other Antibiotics	Types of *Staphylococcus aureus*						Susceptible strains from total	%
	a	b	c	d	e	Others		
Ceftriaxone	0/15	0/4	0/4	0/4	2/3	3/17	5/47	10.6
Chloramphenicol	15/15	3/4	2/4	1/4	2/3	14/17	37/47	78.7
Ciprofloxacin	15/15	4/4	4/4	4/4	3/3	16/17	46/47	97.8
Imipenem	15/15	4/4	4/4	4/4	3/3	16/17	46/47	97.8
Tetracycline	4/15	2/4	0/4	1/4	2/3	4/17	13/47	27.6
Trimethoprim-sulfamethoxazole	15/15	4/4	4/4	4/4	3/3	15/17	45/47	95.7
Clindamycin	0/15	0/4	1/4	0/4	1/3	2/17	4/47	5
Erythromycin	13/15	2/4	2/4	1/4	3/3	8/17	29/47	61.7
Vancomycin	15/15	4/4	4/4	4/4	3/3	17/17	47/47	100
Group %[a]	67	67	67	67	56	11		

Group %[a] : group % of all susceptible and all resistant

나. Chloramphenicol에 대한 최소 억제 농도

1) *Staph. aureus*의 최소 억제 농도(MIC)

Chloramphenicol에 대한 *Staph. aureus*의 내성균은 아직 분리되지 않았고, chloramphenicol에 대한 MIC는 12.5㎍/㎖ 농도에서 peak를 이루는 높은 감수성을 보였다고 보고된바 있다(강, 1990).

Fig. 5에서 *Staph. aureus* CU 1164, CU 1165 및 CU 1166은 chloramphenicol을 각각 50㎍/㎖, 30㎍/㎖ 및 15㎍/㎖의 농도로 희석하여 37℃에서 16h동안 배양한 후 absorbance를 측정한 결과로서,

chloramphenicol의 농도가 A) 50μg/㎖, B) 30μg/㎖일 때 유방염 균주가 전혀 생장을 하지 못하였고, C) 15μg/㎖의 농도로 희석한 경우에는 유방염 균주의 생장이 되고 있음을 알 수 있어서, 최소 억제 농도 (MIC)는 30 μg/㎖로 나타났다. 사용된 균주는 genome type d형으로서 균주간의 차이는 나타내지 않았다.

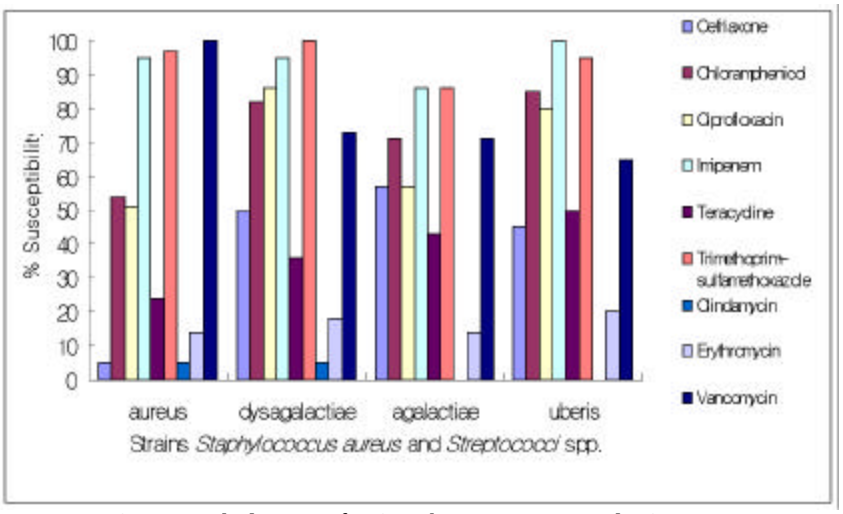
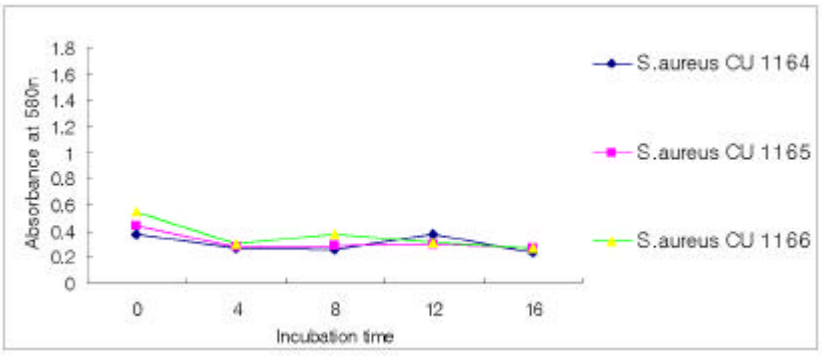


Fig. 4. Susceptibility of *Staph. aureus* and *Streptococcus* spp. against tetracycline antibiotics

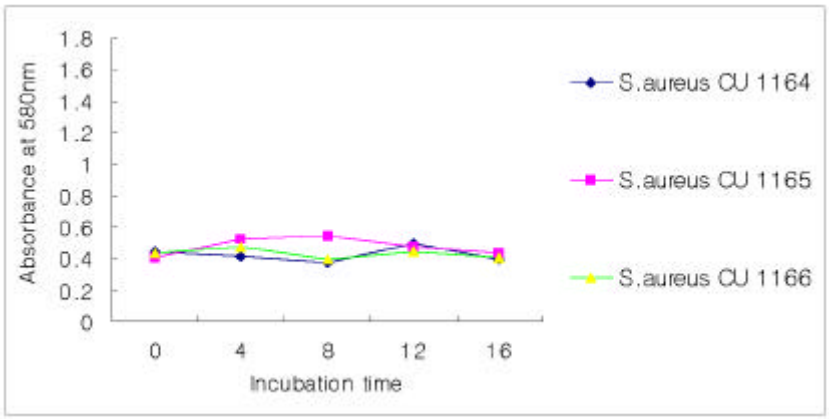
Table 15. Susceptibility of *Streptococcus* spp. against tetracycline antibiotics

Other Antibiotics	22 Strains of *Str. dysagalatiae*		7 Strains of *Str. agalatiae*		20 Strains of *Str. uberis*	
	Susceptible	%	Susceptible	%	Susceptible	%
Ceftriaxone	11/22	50	4/7	57	9/20	45
Chloramphenicol	18/22	82	5/7	71	17/20	85
Ciprofloxacin	19/22	86	4/7	57	16/20	80
Imipenem	21/22	95	6/7	86	20/20	100
Tetracycline	8/22	36	3/7	43	10/20	50
Trimethoprim-sulfamethoxazole	22/22	100	6/7	86	19/20	95
Clindamycin	1/22	5	0/7	0	0/20	0
Erythromycin	4/22	18	1/7	14	4/20	20
Vancomycin	16/22	73	5/7	71	13/20	65

A)



B)



C)

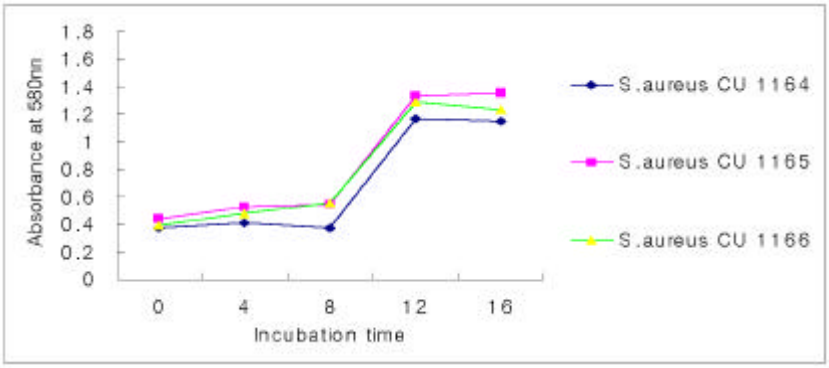


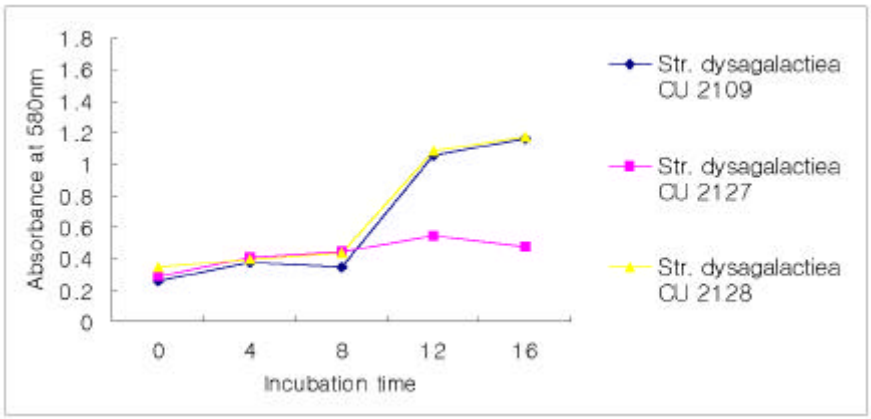
Fig. 5. Absorbance of *Staph. aureus* culture incubated in the medium containing A) 50㎍/㎖, B) 30㎍/㎖ and C) 15㎍/㎖ of chloramphenicol at 37℃ for 16h

2) *Str. dysagalactiae*의 최소 억제 농도

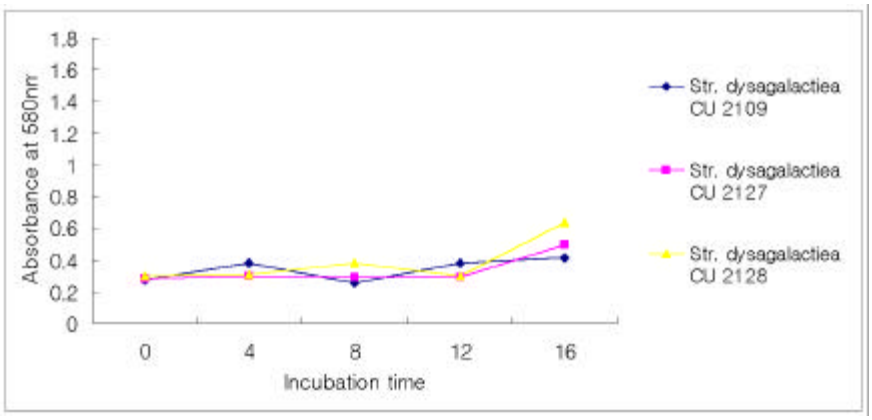
Fig. 6에서는 *Str. dysagalactiae*에 속한 균주 CU 2109, CU 2127 및 CU 2128에 대해 최소 억제 농도에 대한 시험 결과를 나타내고 있다. CU 2109와 CU 2128은 50μg/㎖ 농도에서 균주의 생장이 일어나지 않았으나, 30μg/㎖ 농도에서는 2개 균주에서 생장이 되었으므로 MC는 50μg/㎖이며, CU 2127은 50μg/㎖과 30μg/㎖ 농도에서 균주의 생장이 일어나지 않았으며, 15μg/㎖ 농도에서 생장이 일어났음을 알 수 있어서 MC는 30μg/㎖인 것으로 확인되었다.

*Str. dysagalactiea*는 균주에 따라 chloramphenicol에 대한 감수성에 차이가 나타났으며 CU 2109와 CU 2128은 저항성 균주로 판단된다.

A)



B)



C)

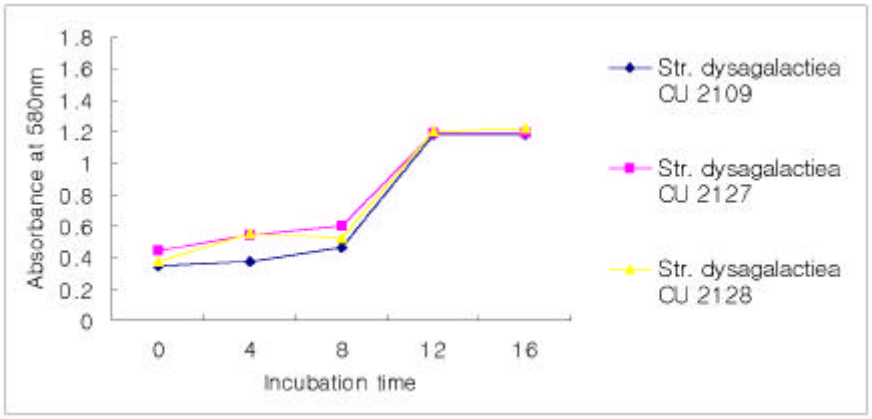
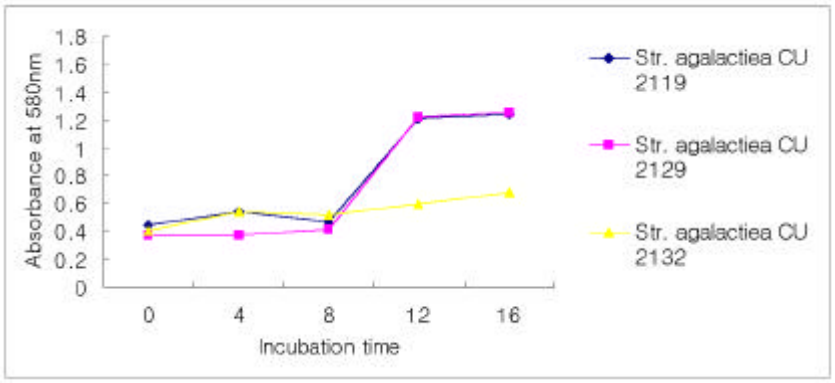


Fig. 6. Absorbance of *Str. dysagalactiae* culture incubated in the medium containing A) 50㎍/㎖, B) 30㎍/㎖ and C) 15㎍/㎖ of chloramphenicol at 37℃ for 16h

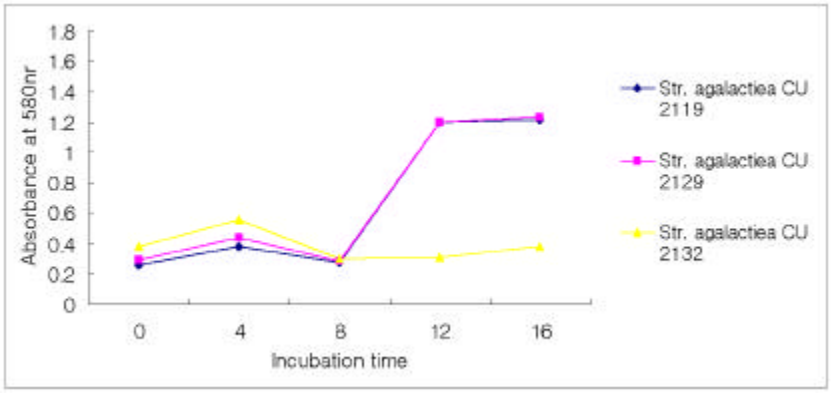
3) *Str. agalactiae* 의 최소 억제 농도

Fig. 7에서는 *Str. agalactiae*에 속한 균주 CU 2119, CU 2129 및 CU 2132에 대한 최소 억제 농도에 대한 시험 결과를 나타내고 있다. CU 2119와 CU 2129는 chloramphenicol을 본 시험의 최고 농도인 50㎍/㎖ 투여했는데도 균주가 생장하는 것으로 보아 강한 내성균주로 판단 할 수 있고, 이와는 반대로 같은 group인 CU2132은 각각의 50㎍/㎖와 30㎍/㎖의 농도에서 균주의 성장이 일어나지 않고, 15㎍/㎖의 농도에서 균주가 성장을 한 것으로 보아 MC는 30㎍/㎖이라고 판단되었다. 동일한 종의 균주 중에서 감수성에 큰 차이를 나타낸 내성 균주라고 판단된다.

A)



B)



C)

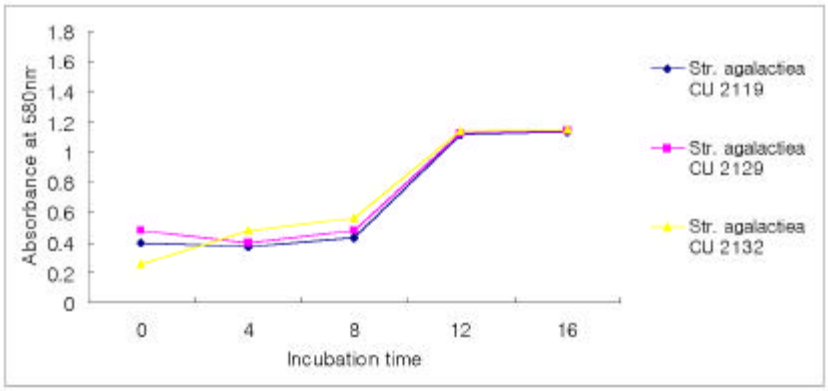


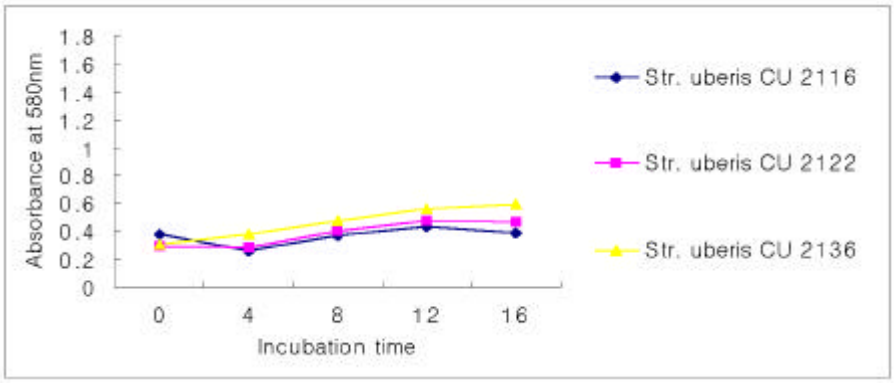
Fig. 7. Absorbance of *Str. agalactiae* culture incubated in the medium containing A) 50㎍/㎖, B) 30㎍/㎖ and C) 15㎍/㎖ of chloramphenicol at 37℃ for 16h

4) *Str. uberis*의 최소 억제 농도

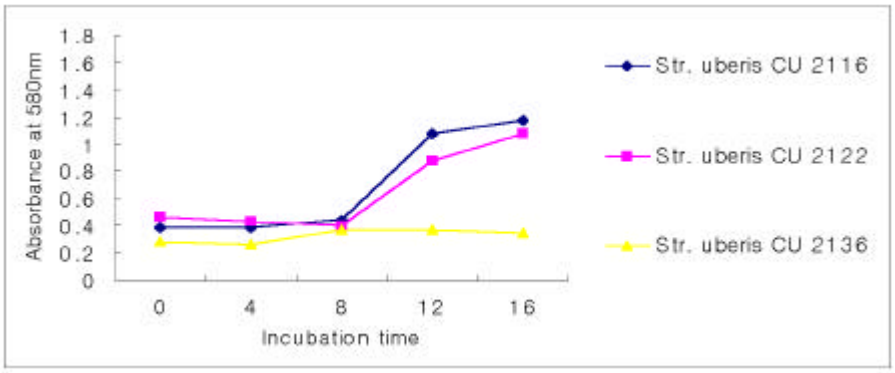
Fig. 8에서는 *Str. uberis*에 속한 균주 CU 2116, CU 2122 및 CU 2136에 대한 최소 억제 농도에 관한 시험 결과를 나타내고 있다. CU 2116와 CU 2122는 50μg/㎖ 농도에서 균주가 생장하지 않았고, 30μg/㎖ 농도에서 균주가 생장하는 것으로 보아 MC는 50μg/㎖라고 판단되며, CU2136 균주는 30μg/㎖ 농도에서도 균주가 생장하지 못하였으나, 15μg/㎖ 농도에서 생장한 것으로 보아 MC는 30μg/㎖ 라고 판단된다.

*Str. uberis*에 있어서도 chloramphenicol에 대한 저항성 균주로 CU 2116과 CU 2122는 genome pattern에 있어서도 유사한 상태를 나타내었다.

A)



B)



C)

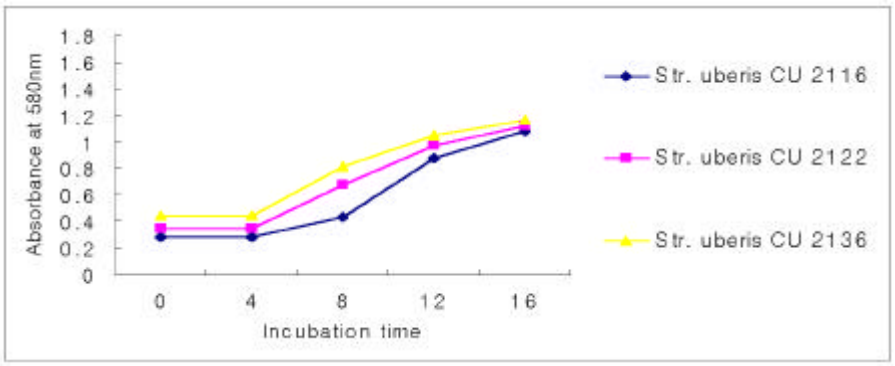


Fig. 8. Absorbance of *Str. uberis* culture incubated in the medium containing A) 50μg/㎖, B) 30μg/㎖ and C) 15μg/㎖ of chloramphenicol at 37℃ for 16h

다. 항생제 저항성 gene 확인

β-Lactamase gene을 이용한 분리균주의 저항성을 판별 할 수 있었다. 페니실린 계통의 저항성 gene의 PCR 방법을 이용한 판별 결과를 표준 균주에 있어서 β-lactamase gene의 specific primer BlaZ I과 II를 이용한 PCR products를 Fig. 9에 제시하였다. 22개의 표준균주 가운데 2개를 제외한 모든 균주에서 저항성을 갖고 있는 것으로 나타났다. Fig. 10은 *Staphylococcus aureus*의 β-lactamase gene PCR 결과이며, Fig. 11은 *Streptococcus* spp.이다. 분리 균주 144개 가운데에서 140개가 β-lactamase gene을 갖는 것으로 나타났다.

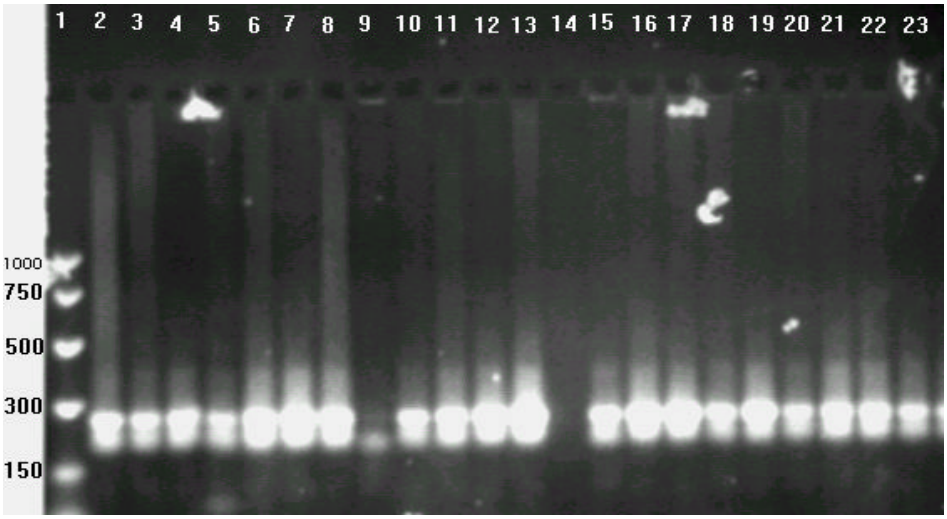


Fig. 9. β-lactamase gene PCR products of standard strains
Lane 1; size marker, Lane 2; *Streptococcus agalactiae* CU, lane 3; *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, lane 4; *Streptococcus uberis* CU, lane 5; *Streptococcus uberis* ATCC 27958, lane 6; *Streptococcus dysagalactiae* 27957, lane 7; *Streptococcus pyogenes* CU, lane 8; *Staphylococcus epidermidis* CU, lane 9; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, lane 10; *Staphylococcus hyicus* NVRI, lane 11; *Staphylococcus aureus* NCTC 9393, lane 12; *Staphylococcus aureus* FRI 913, lane 13; *Staphylococcus aureus* ATCC 13515, lane 14; *Staphylococcus aureus* MNHOCH, lane 15; *Staphylococcus aureus* MNDON, lane 16; *Staphylococcus aureus* FRI 472, lane 17; *Staphylococcus aureus* FRI 326, lane 18; *Staphylococcus aureus* RN4220 pMN403, lane 19; *Staphylococcus aureus* FRI MN8, lane 20; *Staphylococcus aureus* RN4220, lane 21; *Staphylococcus aureus* 805(T), lane 22; *Staphylococcus aureus* 807(C), lane 23; *Staphylococcus aureus* 877(A-S)

Fig. 10. β-lactamase gene of *Staphylococcus aureus*

Lane 1; size marker, lane 2; CU 1101, lane 3; CU 1102, lane 4; CU 1104, lane 5; CU 1105, lane6; CU 1106, lane 7; CU 1107, lane 8; CU 1108, lane 9; CU 1109, lane 10; CU 1110, lane 11; CU 1111, lane 12; CU 1112, lane 13; CU 1113, lane 14; CU 1114, lane 15; CU 1115, lane 16; CU 1116, lane 17; CU 1117, lane 18; CU 1118, lane 19; CU 1119, lane 20; CU 1121, lane 21; CU 1122, lane 22; CU 1123, lane 23; CU 1125, lane 24; CU 1126, lane 25; CU 1129

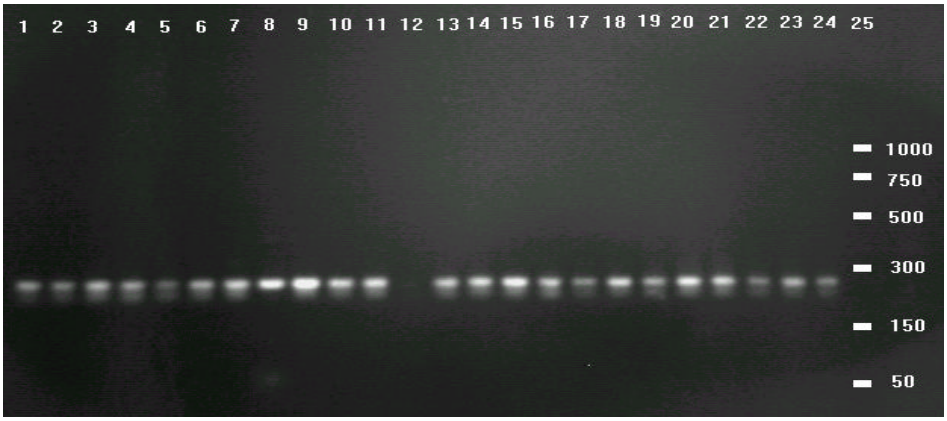


Fig. 11. β-lactamase gene of *Streptococcus* spp.

Lane 1; CU 2101, lane 2; CU 2102, lane 3; CU 2103, lane 4; CU 2104, lane 5; CU 2105, lane 6; CU 2106, lane 7; CU 2107, lane 8; CU 2108, lane 9; CU 2109, lane 10; CU 2110, lane 11; CU 2110, lane 12; CU 2112, lane 13; CU 1113, lane 14; CU 2114, lane 15; CU 2115, lane 16; CU 2116, lane 17; CU 2117, lane 17; CU 2117, lane 18; CU 2118, lane 19; CU 2119, lane 20; CU 2120, lane 21; CU 2121, lane 22; CU 2122, lane 23; CU 2123, lane 24; CU 2124, lane 25; size marker

라. 소독제에 대한 감수성

Table 16과 Fig. 12에서는 여러 소독제제에 대한 *Staph. aureus*의 감수성정도를 나타냈는데, 콜타르 유도체합제인 Longlife 250S의 경우 100%의 감수성을 나타냈으며, 전체적으로는 92%의 높은 감수성을 보였고, 콜타르 유도체합제인 FarmfluidS의 경우 100%의 감수성을 나타냈으나, 전체적으로는 89%의 감수성을 보였다. 4급 암모늄제제인 Germex의 경우는 100%의 감수성을 보였고, 전체적으로도 *Staph. aureus* 36 균주 중에서 35 균주가 감수성을 보여 소독제제로서 매우 높은 감수성을 보였다. 요오드제제인 Betadin의 경우 a, b, 및 h Type에서 100% 정도의 감수성을 보였고, 전체적으로는 89% 정도의 감수성을 보였다.

페놀류인 Danzol의 경우 a와 h Type에서 각각 100% 정도의 감수성을 보였고, 전체적으로는 83%의 감수성을 보였다. *Staph. aureus* 경우 4급암모늄제제인 Germex가 소독제로서 가장 높은 억제율을 보이는 것으로 나타났다. *Staph. aureus*의 type에 따른 소독제에 대한 감수성 변화 성향은 고도의 연관성이 있는 것으로 나타났다.

Table 17과 Fig. 13에서는 여러 소독제제에 대한 *Streptococcus* spp.의 감수성 정도를 나타냈는데, 콜타르 유도체합제인 Longlife 250S의 경우 *Str. dysagalactiae*, *Str. agalactiae* 및 *Str. uberis*에서 약 71 90% 정도의 감수성을 보였고, 콜타르 유도체합제인 FarmfluidS의 경우 *Str. dysagalactiae*와 *Str. agalatiae* 및 *Str. uberis*에서 약 86 100% 정도의 감수성을 보였다. 4급 암모늄제제인 Germex의 경우는 *Str. dysagalactiae*와 *Str. agalactiae* 및 *Str. uberis*에서 약 71 86% 정도의 감수성을 보였고, 요오드제제인 Betadin의 경우 *Str. dysagalactiae*와 *Str. agalactiae* 및 *Str. uberis*에서 약 95 100% 정도의 감수성을 보였고, 페놀류인 Danzol의 경우 *Str. dysagalactiae*, *Str. agalactiae* 및 *Str. uberis*에서 약 57 70%정도의 감수성을 보였다. 연쇄상구균의 경우 요오드제로 쓰인 Betadin이 소독제로서 가장 높은 억제율을 보이는 것으로 나타났다.

Table 16. Susceptibility of *Staph. aureus* against disinfectants

Disinfectant		Types of *Staph. aureus*						Number of susceptibility	%
		a	b	c	d	h	Others		
콜타르 유도합체 합제	Longlife 250S	3/3	3/3	4/4	5/5	3/3	18/21	33/36	92
	FarmfluidS	3/3	3/3	2/4	5/5	3/3	19/21	32/36	89
4급 암모늄제	Germex	3/3	3/3	4/4	5/5	3/3	20/21	35/36	97
요오드제	Betadin	3/3	3/3	3/4	4/5	3/3	18/21	32/36	89
페놀류	Danzol	3/3	2/3	3/4	4/5	3/3	18/21	30/36	83
Group %[a]		100	80	40	60	100	0		

Group %[a] : group % of all susceptible and all resistant

Table 17. Susceptibility of *Streptococcus* spp. against disinfectants

Disinfectant		22 Strains of *Str. dysagalactiae*		7 Strains of *Str. agalactiae*		20 Strains of *Str. uberis*	
		Susceptible	%	Susceptible	%	Susceptible	%
콜타르 유도체 합제	Longlife 250S	19	86	5	71	18	90
	FarmfluidS	20	91	6	86	20	100
4급 암모늄제	Germex	19	86	5	71	16	80
요오드제	Betadin	22	100	7	100	19	95
페놀류	Danzol	14	64	4	57	14	70

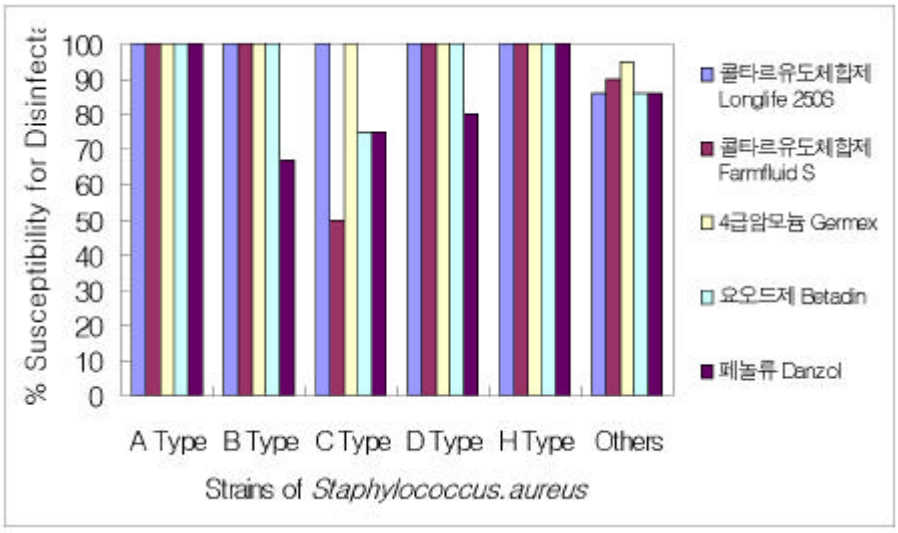


Fig. 12. Susceptibility of *Staph. aureus* against disinfectants

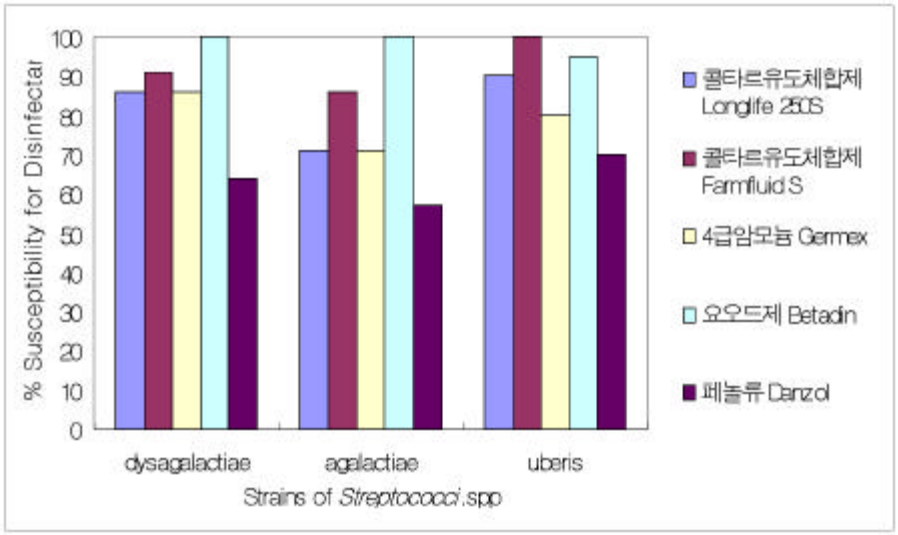


Fig. 13. Susceptibility of *Streptococcus* spp. against disinfectants

4 결론

유방염의 원인균인 *Staph. aureus* 47 균주와 *Streptococcus* 49 균주에 대해 항생제와 소독제에 대한 감수성 실험을 실시하여 다음 결과를 얻었다.

*Staph. aureus*는 ampicillin-sulbactam과 vancomycin에 대하여 가장 높은 감수성을 보였고, trimethoprim-sulfamethoxazole과 imipenem 순서로 높은 감수성을 보였다. *Str. dysagalactiae*은 trimethoprim-sulfamethoxazole, imipenem, ampicillin-sulbactam 순서로 강한 감수성을 보였으며, *Str. agalactiae* 균주는 amoxicillin-clavulanic, ampicillin-sulbactam 및 imipenem 등에 강한 감수성을 보였고 *Str. uberis*의 경우 amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, imipenem 및 trimethoprim-sulfamethoxazole 순서로 높은 감수성을 보였다.

*Staph. aureus*의 소독제에 대한 감수성은 4급 암모늄제인 Germex에 대하여 가장 높은 감수성을 보였고, *Str. dysagalactiae*는 요오드제인 Betadin에 높은 감수성을 보였으며 또한 *Str. agalactiae*의 경우에도 Betadin이 높은 감수성을 보였고, *Str. uberis*는 Farmfluid S에 대하여 높은 감수성을 나타내었다.

Chloramphenicol에 대한 최소억제농도를 Bioscreen 장치로 측정한 결과 *Staph. aureus* 30㎍/㎖, *Str. agalactiae*와 *Str. uberis*는 50㎍/㎖이며, *Str. dysagalactiae*는 50㎍/㎖에도 억제가 되지 않았다.

제 4 절 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus* spp.의 genotyping 방법의 신속 간편화를 위한 RAPD 방법의 적용가능성 검토 및 현장 적응 방안

SUMMARY

RAPD method of genotyping and strain identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp. could obtain reliable results which showed simillar degree of strain differentiation ability and reproducibility as PFGE in shorter time with less analyzing cost. Isolated genomic DNA was amplified with newly designed primer KIKI. The PCR condition was initial denaturation at 93℃ for 3 minutes, 35 cycles of denaturation at 93℃ for 1 mimutes annealing at 37℃ for 1 minutes and extension 72℃ for 1 minutes, and final extension at 72℃ for 4 minutes. The amplified DNA product was electrophoresed at 100 volt for 2 hours with 1.5% agarose gel.

For the practical application of the results, common susceptible antibiotics against all the isolated strains turned out to be amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam and chloramphenicol. Bacterial strains sensitive to antibiotics and disinfectants could be related with PFGE genotypes.

1. 서론

목장의 우유생산 환경에서 유방염 원인균의 확산을 적절히 관리하고 치료대책을 수립함에 있어서 원인균의 특성과 균종 및 균주의 동정과 genotyping이 필요하며 저렴한 경비로 간편하게 이용 할 수 있는 방법을 고안하는 것은 매우 중요한 과제이다(Romeo, 1999: Stephen 등, 1994).

일반적으로 병원성균을 분류 혹은 typing 함에 있어서 가장 그 분별능력이 민감하고 재현성이 높은 방법은 PFGE 방법인 것으로 알려지고 있다(Tynkkynen 등, 1999: Young 등, 1994: Manuel 등, 1993).

그러나 PFGE 방법은 경비가 많이 소요되는 방법으로서 그 시험방법도 복잡한 절차를 걸치며 오랜 시간이 소요되는 몇 가지 해결해야할 문제를 갖고 있다.

국내외 낙농가의 가장 중요한 관심사항의 하나는 젖소의 유방염을 치료하는 것일 것이다. 경제적인 손실은 실로 엄청날 뿐만 아니라, 근래에 와서는 유방염의 치료에 쓰이는 항생물질들이 원유의 잔류물질로서 국민보건위생에 중요 지표로 되고 있다. 실례로 국내 가공업계 가운데에서도 잔류물질 파동으로 급격한 매출감소를 감수 할 수밖에 없었다.

국민보건에 있어서 중요한 결과를 초래하게 하는 원인의 올바른 진단이 무엇보다도 중요한 선결과제이다. 유방염의 원인 균주의 동정과 조기진단에 대한 연구결과로부터 PFGE에 의한 방법이 유용한 것으로 확인되었으며, 이와 유사한 목적으로 사용가능한 방법으로서 RAPD 기법을 검토하기 위하여 본 연구가 수행되었고, 균주동정과 genotyping에 있어서 PFGE 방법과 RAPD 방법을 비교 분석하고 원유 중에 있는 체세포와 미생물을 진단하는 방법을 검토하기 위하여 수행되었다.

2. 재료 및 방법

가. 공시균주

본 연구에 이용된 균주는 서울대학교 수의과대학에서 분양 받은 표준균주와 경기도 안성시 일원의 낙농농가에서 직접 분리 동정한 균주를 이용하였다. 그 내용은 다음의 Table 1, Table 2 및 Table 3에 제시하였다. 표준균주 및 분리된 균주는 BHI(Brain heart infusion) broth(Difco. U.S.A)에 배양하여 연구에 이용되었다.

나. Genomic DNA의 분리

하룻밤 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 원심분리하고, 50 mM EDTA에 세척한 뒤에 Wizard™ Genomic DNA purification kit (Promega, U.S.A)를 이용하여 분리하였다.

다. PCR 조건과 primer의 결정

PCR 수행에 있어서 polymerase와 dNTP는 PreMix™-Top (Bioneer, Korea)를 이용하였고, $MgCl_2$의 농도는 1.5mM을 기준으로 하였다. Thermal cycler는 Perkin elmer 2400으로 수행하였다. RAPD에 있어서의 cycler 조건은 최초 denaturation을 93℃에서 3분에서 수행하고 denaturation 93℃에서 1분, annealing 37℃에서 1분 및 extension 72℃에서 1분을 35회 반

복하였고, 마지막 extension은 72℃에 4분간 수행하였다. 전기영동은 1.5% agarose gel을 이용하여 100V에서 2시간 수행하였다.

RAPD에 적정한 primer를 선정하기 위하여 7개의 primer를 이용하였으며, 각각의 primer들은 염기의 비율(G+C content)에 따라 선별되었고, KIKI과 KIKII primer는 본 연구실에서 설계하였다.

Table 1. References strains of *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus* spp.

Streptococcus spp..		
1.	*Streptococcus agalactiae* CU	
2.	*Streptococcus agalactiae* ATCC 13813	
3.	*Streptococcus uberis* CU	
4.	*Streptococcus uberis* ATCC 27985	
5.	*Streptococcus dysagalactiae* ATCC 27957	
6.	*Streptococcus pyogenes* CU	
Staphylococcus spp.		
7.	*Staphylococcus epidermidis* CU	
8.	*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228	
9.	*Staphylococcus hyicus* NVRI	
10.	*Staphylococcus aureus* NCTC 9393	
11.	*Staphylococcus aureus* FRI 913	(Entertoxin A-C)
12.	*Staphylococcus aureus* ATCC 13515	(Entertoxin A)
13.	*Staphylococcus aureus* MNHCC	(Entertoxin B)
14.	*Staphylococcus aureus* MNDCN	(Entertoxin C)
15.	*Staphylococcus aureus* FRI 472	(Entertoxin D)
16.	*Staphylococcus aureus* FRI 326	(Entertoxin E)
17.	*Staphylococcus aureus* RN4220	(Entertoxin G-bovine)
18.	*Staphylococcus aureus* FRI MN8	TSST-1
19.	*Staphylococcus aureus* RN4220	No toxin
20.	*Staphylococcus aureus* 805(T)	
21.	*Staphylococcus aureus* 807(C)	
22.	*Staphylococcus aureus* 877(A-S)	

Table 2. Strains of *Staphylococcus* spp.

Farm	Strain	Origin
중앙 (9)	CU 1101	깔짚
	CU 1102	초산우 유두공
	CU 1103	경산우 질
	CU 1104	개
	CU 1105	축사
	CU 1106	사료
	CU 1107	비경
	CU 1108	질
	CU 1109	직장
펠렉스 (5)	CU 1110	개
	CU 1111	공기
	CU 1112	개
	CU 1113	우유
	CU 1114	우유
웅수 (9)	CU 1115	경산우4 질②
	CU 1116	이유후 비경
	CU 1117	산우4 질①
	CU 1118	착유기 內
	CU 1119	개
	CU 1120	사료
	CU 1121	송아지 비경
	CU 1122	우유
	CU 1123	우유
주림	CU 1124	초산우 Milk
	CU 1125	초산우 유두공
주림 (9)	CU 1126	경산우 유두공
	CU 1127	유방염 유두공
	CU 1128	유방염 우유
	CU 1129	축사
	CU 1130	초산우 우유
	CU 1131	경산우 우유
	CU 1132	착유기 내부
세공주 (11)	CU 1133	축사
	CU 1134	착유기 내부
	CU 1135	개
	CU 1136	우유
	CU 1137	초산우 우유
	CU 1138	우유
	CU 1139	우유
	CU 1140	건유기 비경
	CU 1141	경산우 비경
	CU 1142	경산우 직장
	CU 1143	경산우 유두공
성원 (12)	CU 1144	Bed
	CU 1145	Dog
	CU 1146	경산우 Milk 9
	CU 1147	이유후 직장
	CU 1148	경산우 비경
	CU 1149	Air
	CU 1150	Bed

Farm	Strain	Origin
성원 (12)	CUI151	관리자
	CUI152	비경
	CUI153	직장
	CUI154	유두공
	CUI155	송아지 직장
초야 (12)	CUI156	경산우 우유 4
	CUI157	사료
	CUI158	축사
	CUI159	착유기 내부
	CUI160	개
	CUI161	우유 4
	CUI162	우유 8
	CUI163	우유 7
	CUI164	송아지 비경
	CUI165	송아지 직장
	CUI166	송아지 질
	CUI167	경산우 비경
영오 (9)	CUI168	개
	CUI169	경산우 체면
	CUI170	관리자
	CUI171	초산우 유두공
영오 (9)	CUI172	경산우 유두공
	CUI173	초산우 유두공
	CUI174	우유 3693
	CUI175	착유기 內
	CUI176	깔짚
오현경 (6)	CUI177	우유 8
	CUI178	우유 2
	CUI179	유방염 우유 4
	CUI180	우유 2
	CUI181	우유 20
	CUI182	개
건천 (10)	CUI183	미경산우 질
	CUI184	경산우 체면
	CUI185	유방염 우유 1
	CUI186	유방염 우유 2
	CUI187	축사
	CUI188	사료
	CUI189	개
	CUI190	축사
	CUI191	송아지 비경
	CUI192	송아지 직장

Table 3. Strains of *Streptococcus* spp.

우 유 시 료					
Farm	Strain	Origin	Farm	Strain	Origin
중앙	CU2101	초산우 Milk 12	성원	CU2112	Milk 2
중앙	CU2102	유방염 Milk 21	성원	CU2113	Milk 1
펠렉스	CU2103	경산우 Milk 7	초야	CU2114	Milk 3
주림	CU2104	경산우 Milk 1	초야	CU2115	Milk 4
중앙	CU2105	Milk 15	초야	CU2116	Milk 9
중앙	CU2106	Milk 6	초야	CU2117	Milk 8
중앙	CU2107	Milk 10	영오	CU2118	Milk 3643
펠렉스	CU2108	Milk 6	영오	CU2119	Milk 8040
펠렉스	CU2109	Milk 2	영오	CU2120	Milk 3
웅수	CU2110	Milk 1	오현경	CU2121	Milk 5
성원	CU2111	Milk 4	건천	CU2122	Milk 8
목 장 환 경			우 체 표 면		
Farm	Strain	Origin	Farm	Strain	Origin
중앙	CU2123	Feed stuff	중앙	CU2136	경산우 유두공
중앙	CU2124	Equip 내부	중앙	CU2137	경산우 질
펠렉스	CU2125	Dog	중앙	CU2138	경산우 비경
펠렉스	CU2126	Air	중앙	CU2139	경산우 Side
펠렉스	CU2127	Bedding	중앙	CU2140	이유후 직장
건천	CU2128	Handler	주림	CU2141	유방염 Side
초야	CU2129	Water	초야	CU2142	송아지 비경
영오	CU2130	Bedding	초야	CU2143	직장
영오	CU2131	Equip 내부	초야	CU2144	경산우 비경
영오	CU2132	Air	초야	CU2145	질
영오	CU2133	Handler	영오	CU2146	질
오현경	CU2134	Water	영오	CU2147	송아지 비경
오현경	CU2135	Equip 내부	영오	CU2148	경산우 유두공
			영오	CU2149	직장
			건천	CU2150	경산우 비경

3. 결과

가. 균주동정 및 genotyping에서 PFGE 방법의 대체 목적으로 RAPD 적용가능성

1) RAPD에 의한 균주의 genotyping 분별 능력 비교

Table 4. PFGE와 RAPD에 의한 genotyping 분별능력

Strains	Total Number	Number of genotype(s) by	
		RAPD	PFGE
Staphylococcus aureus	57	8	19
Streptococcus uberis	19	7	7
Streptococcus dysagalactiae	22	7	11

Table 4에서 제시된 바와 같이 전염성 유방염 원인균주 *Staph. aureus* 57 균주를 dendrogram을 이용한 genotyping한 결과 RAPD 방법을 적용한 경우에는 8개의 genotype으로 분별되는 반면 PFGE 방법으로 시행한 경우에는 각각 19개의 genotype을 얻게되었다. 또한 *Str. uberis* 19 분리균주를 typing한 결과 RAPD의 경우 7 type으로 그리고 PFGE의 경우 7 type으로 분류할 수 있었으며, *Str. dysagalactiae* 22 균주에 대한 genotyping 결과 RAPD 방법을 이용한 경우 7 type, PFGE 의 경우 6 type으로 분류 가능하였다. 위의 genotyping 분별 능력을 유방염 원인균의 경우에서 비교 분석할 경우 *Staphylococcus aureus*와 *Str. dysagalactiae* PFGE 방법이 더 우수한 것으로 나타났으나 *Str. uberis*는 동일한 수준인 것으로 나타났다.

RAPD방법이 약간의 분별력의 부족한 면이 있으나 임상적인 적용에 있어서는 적용이 가능할 것으로 판단되며, 이 기법은 인간의 병원균 분류에도 활용되고 있다.

Fig. 1과 2에서는 *Str. dysagalactiae*의 primer Re EI을 이용한 RAPD 전기영동과 dendrogram 분석 결과를 제시하였다. Fig. 3에서는 *Str. dysagalactiae*의 분리균주의 PFGE dendrogram을 나타냈다.

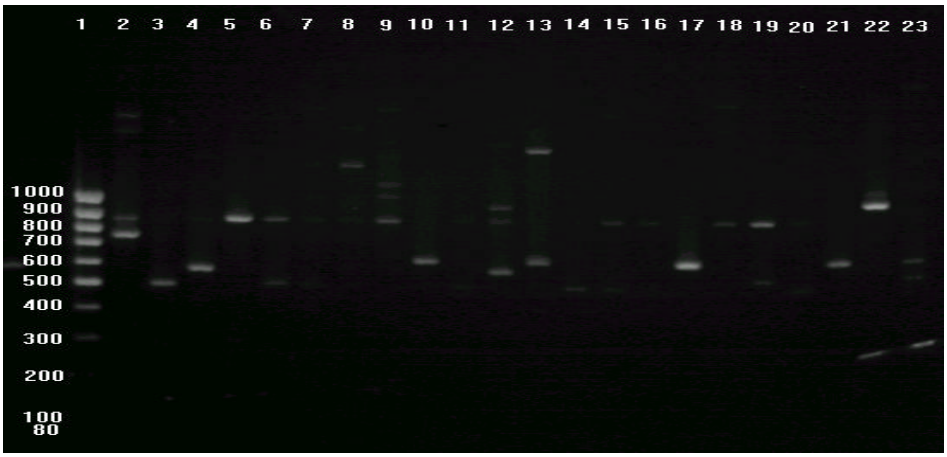


Fig. 1. *Streptococcus dysagalactiae*의 RAPD

Lane 1; size marker, lane 2; CU 2101, lane 3; CU 2103, lane 4; CU 2105, lane 5; CU 2106, lane 6; CU 2107, lane 7; CU 2108, lane 8; CU 2109, lane 9; CU 2112, lane 10; CU 2113, lane 11; CU 2115, lane 12; CU 2118, lane 13; CU 2120, lane 14; CU 2125, lane 15; CU 2127, lane 16; CU 2128, lane 17; CU 2130, lane 18; CU 2134, lane 19; CU 2138, lane 20; CU 2139, lane 21; CU 2141, lane 22; CU 2147, lane 23; CU 2150.

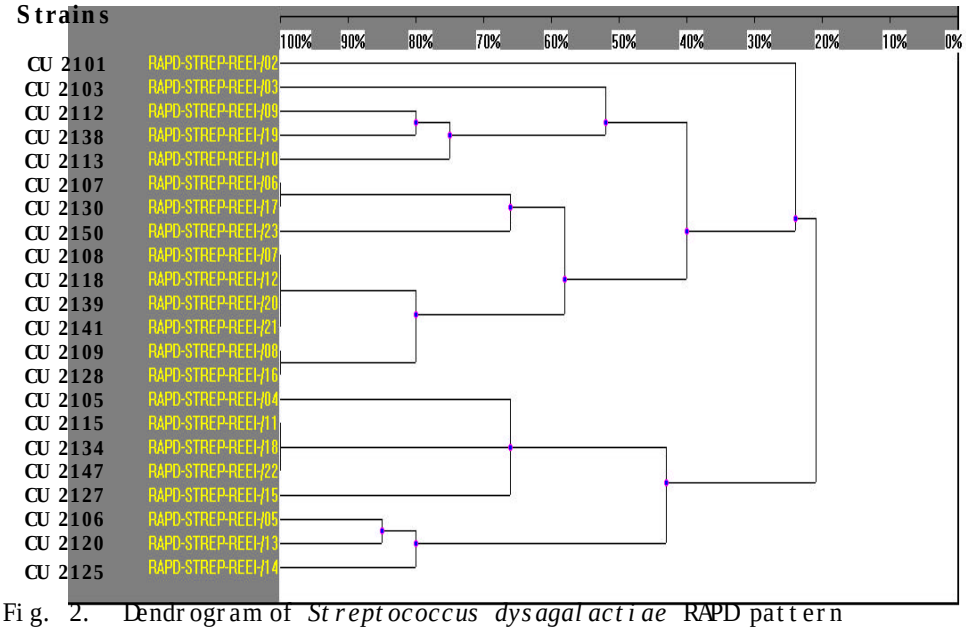


Fig. 2. Dendrogram of *Streptococcus dysagalactiae* RAPD pattern

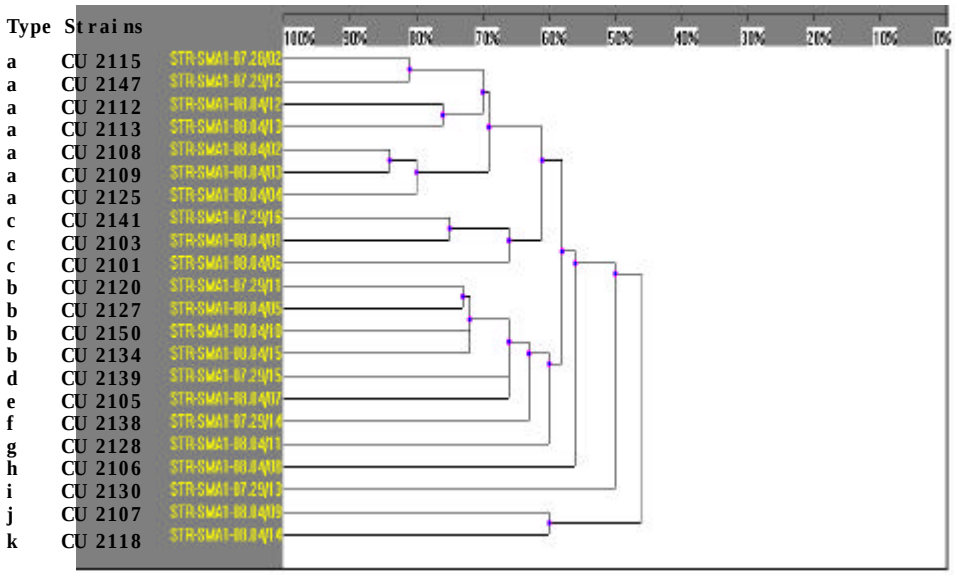


Fig. 3. Dendrogram of *Streptococcus dysagalactiae* 의 PFGE patten dendrogram

2) 적정 primer 의 선정

RAPD에 의한 genotype에 있어서 균주 분별력이 높은 primer를 선정하기 위하여 표준균주 22 균주에 대하여 LAB arbI, ReAI, ReDI, ReEI, GuelI, KIKI 및 KIKII 등 7개의 primer를 선택하였고, 염기서열는 Table 5에 제시하였다. 그리고 각각 primer를 이용한 RAPD 전기영동을 실시하였으며, 그 결과를 근거로 하여 dendrogram 분석을 실시하고 분별력이 가장 우수한 것으로 판명된 KIKI, KIKII 및 LAB arbI 3개의 primer를 선정하였다.

선정된 3개의 primer가 가진 공통점은 그 염기수는 10개이며 서열은 각각 TGCACTGATG, ATGTATCCGG 및 ATGTAACGCC이다. 이들은 G+C mole%가 50% 라는 공통점도 있다. 3개 primer의 표준균주 22 균주에 대한 분별 능력은 공히 9개의 genotype으로 구분하는 능력이 있는 것으로 나타났다.

Fig. 4에서는 표준균주에 대한 KIKI primer를 이용하여 RAPD 분석할 때 나타나는 band pattern과 Fig. 5와 Fig. 6에서는 KIKII primer를 이용하여 RAPD 분석의 band pattern과 dendrogram이 제시되었다.

Table 5. Primer sequences and composition

Primer	Sequence	G+C content (%)
LABarb I	ATGTAACGCC	50
ReA I	TGCACTGGAG	60
ReD I	TCCACGGACG	70
ReE I	ATGTTCCAGG	50
Guel I	AGCAGCGTGG	70
KIK I	TGCACTGATG	50
KIK II	ATGTATCGCG	50

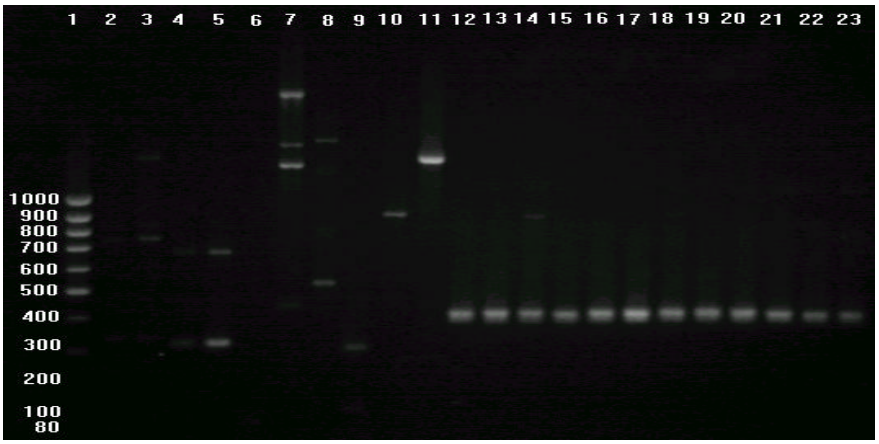


Fig. 4. RAPD genotyping of standard strains of *staphylococcus aureus streptococcus* spp. (use for KIK I)

Lane 1; size marker, Lane 2; *Streptococcus agalactiae* CU, lane 3; *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, lane 4; *Streptococcus uberis* CU, lane 5; *Streptococcus uberis* ATCC 27958, lane 6; *Streptococcus dysagalactiae* 27957, lane 7; *Streptococcus pyogenes* CU, lane 8; *Staphylococcus epidermidis* CU, lane 9; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, lane 10; *Staphylococcus hyicus* NVRI, lane 11; *Staphylococcus aureus* NCTC 9393, lane 12; *Staphylococcus baaureus* FRI 913, lane 13; *Staphylococcus aureus* ATCC 13515, lane 14; *Staphylococcus aureus* MNHOCH, lane 15; *Staphylococcus aureus* MNDON, lane 16; *Staphylococcus aureus* FRI 472, lane 17; *Staphylococcus aureus* FRI 326, lane 18; *Staphylococcus aureus* RN4220 pMIN403, lane 19; *Staphylococcus aureus* FRI MN8, lane 20; *Staphylococcus aureus* RN4220, lane 21; *Staphylococcus aureus* 805(T), lane 22; *Staphylococcus aureus* 807(C), lane 23; *Staphylococcus aureus* 877(A-S)

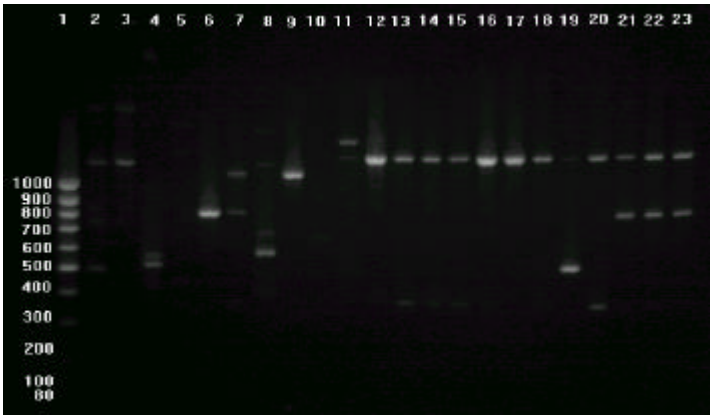


Fig. 5. RAPD genotyping of standard strains of *staphylococcus aureus streptococcus* spp. (use for KIK II)

Lane 1; size marker, Lane 2; *Str. agalactiae* CU, lane 3; *Str. agalactiae* ATCC 13813, lane 4; *Str. uberis* CU, lane 5; *Str. uberis* ATCC 27958, lane 6; *Str. dysagalactiae* 27957, lane 7; *Str. pyogenes* CU, lane 8; *Staphylococcus epidermidis* CU, lane 9; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, lane 10; *Staph. hyicus* NVRI, lane 11; *Staph. aureus* NCTC 9393, lane 12; *Staph. baaureus* FRI 913, lane 13; *Staph. aureus* ATCC 13515, lane 14; *Staph. aureus* MNHOCH, lane 15; *Staph. aureus* MNDON, lane 16; *Staph. aureus* FRI 472, lane 17; *Staph. aureus* FRI 326, lane 18; *Staph. aureus* RN4220 pMN403, lane 19; *Staph. aureus* FRI MN8, lane 20; *Staph. aureus* RN4220, lane 21; *Staph. aureus* 805(T), lane 22; *Staph. aureus* 807(C), lane 23; *Staph. aureus* 877(A-S)

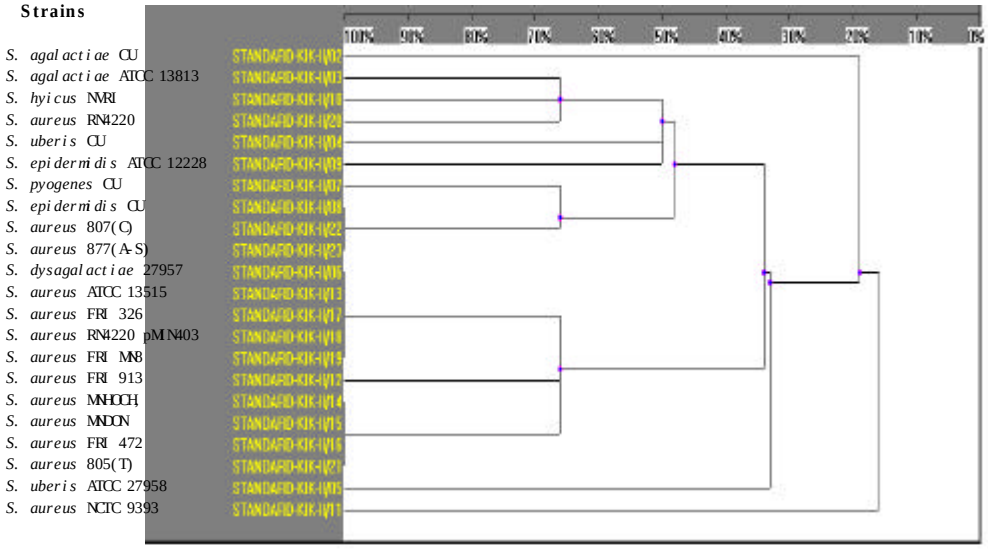
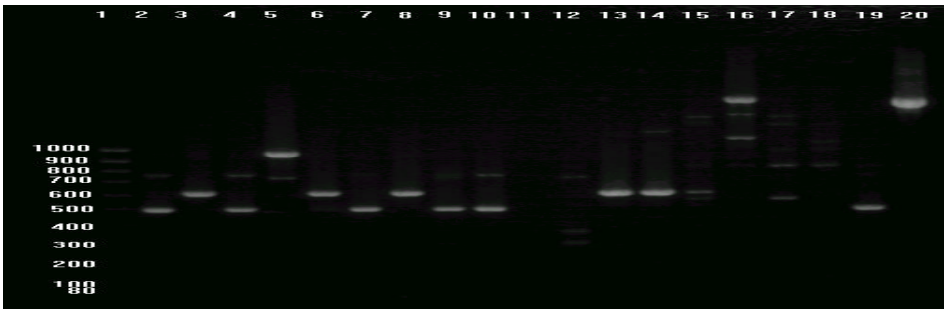


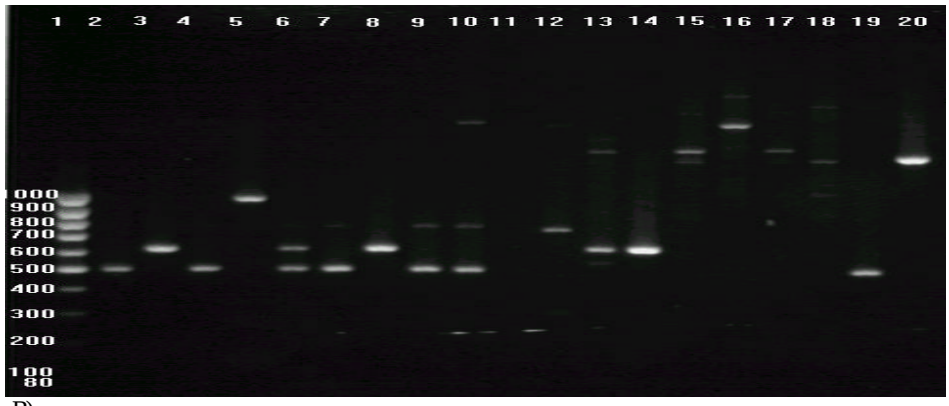
Fig. 6. Dendrogram of RAPD pattern of standard strains of *Staph.*

aureus and *streptococcus* spp. (use for KIKII)

3) **계대 배양된 균주의** RAPD **재현성**



A)



B)

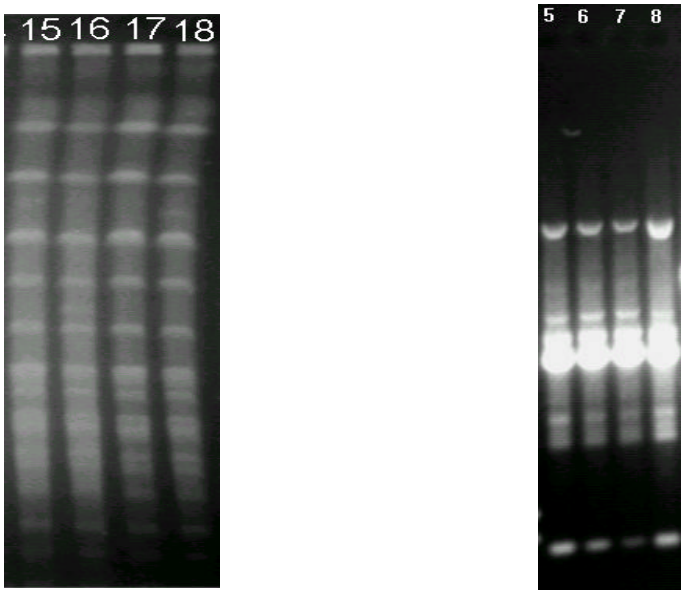
Fig. 7. RAPD pattern of *staphylococcus aureus* and *streptococcus* spp. isolates A); 1st subculture B) 3rd subculture

Lane 1; size marker, lane 2; *S. aureus* CU 1103, lane 3; *S. aureus* CU 1106, lane 4; *S. aureus* CU 1108, lane 5; *S. aureus* CU 1123, lane 6; *S. aureus* CU 1126, lane 7; *S. aureus* CU 1129, lane 8; *S. aureus* CU 1135, lane 9; *S. aureus* CU 1147, lane 10; *S. aureus* CU 1155, lane 12; *S. uberis* CU 2101, lane 12; *S. uberis* CU 2111, lane 13; *S. uberis* CU 2113, lane 14; *S. uberis* CU 2149, lane 15; *S. agalactiae* CU 2114, lane 16; *S. agalactiae* CU 2119, lane 17; *S. agalactiae* CU 2132, lane 18; *S. dysagalactiae* CU 2112, lane 19; *S. dysagalactiae* CU 2115, lane 20; *S. dysagalactiae* CU 2151

Fig. 7**의 상부(**A**)에서는** subculture**를 1회 시행한 후** RAPD pattern**을 제시한 것이고 하부(**B**)의** pattern**은 3회** subculture **한 이후 나타난** RAPD pattern **이다. 각 균주에 대한 계대배양과 더불어 나타나는** band pattern **의 변화는 거의 보이지 않고 동일한 상태를 나타내어** RAPD **방법의 재현성**

을 나타내고 있다.

4) 동일균주에 대한 PFGE 및 RAPD 결과 비교



(A) (B)

Fig. 8. *Staphylococci* spp. 에 있어서 동일한 시료의 PFGE와 RAPD 결과 비교

(A) PFGE

Lane 15 : *Staphylococcus aureus* CU1167

lane 16 : *Staphylococcus aureus* CU1166

lane 17 : *Staphylococcus aureus* CU1165

lane 18 : *Staphylococcus aureus* CU1164

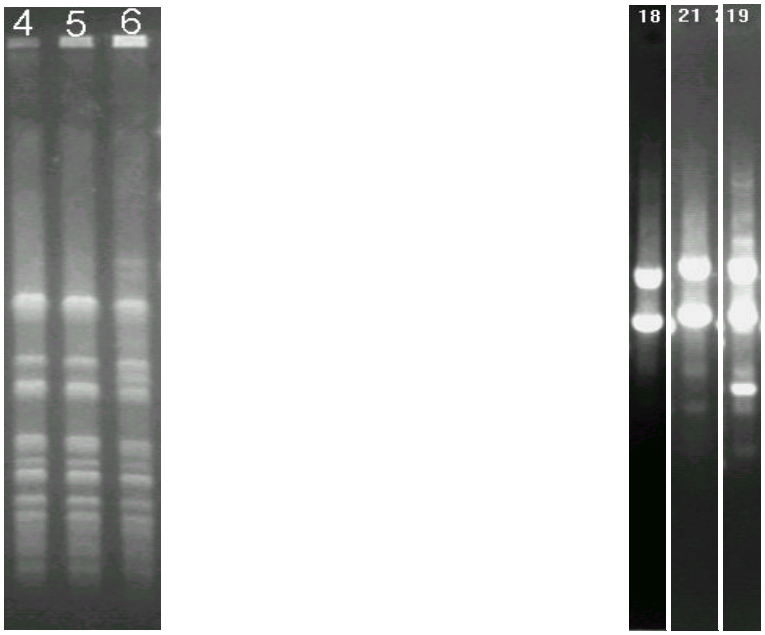
(B) RAPD

Lane 8 : *Staphylococcus aureus* CU1167

lane 7 : *Staphylococcus aureus* CU1166

lane 6 : *Staphylococcus aureus* CU1165

lane 5 : *Staphylococcus aureus* CU1164



(A) (B)

Fig. 9. *Streptococcus* spp.에 있어서 동일한 sample에 대한 PFGE와 RAPD 결과의 비교

(A) PFGE lane 4 : *Streptococcus* CU2122
lane 5 : *Streptococcus* CU2145
lane 6 : *Streptococcus* CU2143

(B) RAPD lane 18 : *Streptococcus* CU2122
lane 21 : *Streptococcus* CU2145
lane 19 : *Streptococcus* CU2143

Fig. 8 및 Fig. 9에서 제시된 결과와 같이 동일한 *Staphylococcus aureus* 균주와 *Streptococcus* spp. 균주는 동일한 pattern을 보이는 것이 확인되었다. 따라서 RAPD 방법도 genotyping에 있어 유용한 도구로 활용이 가능하다는 것을 보여주었다.

나. 현장활용도 증진 방향

1) 목장별 항생제 감수성 성향

항생제에 대한 감수성의 성향 분석결과를 종합하여 유방염 원인균주로서 각 목장에서 분리된 종과 genotype과 감수성이 높은 항생제를 Table 6에 제시하였다. 각 목장에서 분리 동정된 유방염 원인균주가 나타내는 감수성 표를 근거로 하여 항생제의 명칭을 표에 제시하였다.

연구 대상이었던 9 목장에서 분리된 병원균주에게 강력하게 감수성을 나타내는 항생제는 목장에 따라 4 8개로 나타났다. 중앙목장의 경우 amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, chloramphenicol, imipenem, trimethoprim-sulfamethoxazole 및 vancomycin 등이 강력한 생장 억제 및 살균 효과를 나타내며 따라서 이 범위의 항생제 중에서 가격면이나 현실적으로 구입가능 한 약제를 이용할 수 있을 것이다. 성원목장의 경우는 amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, chloramphenicol, imipenem, trimethoprim-sulfamethoxazole, vancomycin, tetracycline 및 ciprofloxacin가 유효한 것으로 확인된바 있다. 9개 목장에서 분리된 모든 균주에게 감수성을 가지는 항생제는 3종으로서 amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin-sulbactam, 및 chloramphenicol 이었다.

2) *Streptococcus uberis*에서 genotyping을 통한 항생제 및 소독제 감수성 추적 예

현장에서 활용할 수 있는 주요 기술정보로서 목장별 분리되는 주요 유방염 원인균에 대하여 genotype 별 항생제와 소독제에 대한 감수성 database를 보관하고 있는 경우 genotyping 결과로서 적절한 항생제 및 소독제선택을 할수 있는 예로 Table 7의 자료를 활용할수 있다.

Table 7에서 제시된 내용은 PFGE 시험 data를 *Str. uberis*에 국한된 자료를 이용하는 sample로 제시되었으나 가축보건위생연구소 분소가 각 도에 3-4개 설치되어 있는 현실이고 또 상당 수준의 시험장비가 구비되어 있는 현실을 감안한다면 권역 내의 유방염 원인균 typing을 본절에서 제시한 결과를 간략화된 기법 RAPD 방법에 근거하여 genotyping을 하여 기초자료를 확보해두면 농가에서 유방염에 대한 치료 또는 예방을 위한 소독제 선택에 대하여 과학적인 지도활동을 할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 6. Genotypes and recommended effective antibiotics for stains isolated from farms.

Farms	Genotypes (PFGE)			Antibiotics * (Recommended)
	Staph. aureus	*Str. uberis*	*Str. dysagalactiae*	
중앙			a, d	Am, SAM, C, IPM, S, Va
초야	c, d, f, h	b, c		Am, SAM, C, IPM, S
영오	a, h	a, d, c	a, d	Am, SAM, C, IPM, S
패랙스	s		a, b	Am, SAM, C, Va
세공주	a, d, f, i, p		c, f	Am, SAM, C, S, Va
건천	g,			Am, SAM, C, S
웅수	b, f, n			Am, SAM, C, IPM, S, Va
오현경		d, g		Am, SAM, C, IPM, S, Va
성원			a	Am, SAM, C, IPM, S, Va, Te, CIP

* amoxicillin-clavulanic acid(Am), ampicillin sulbactam(SAM), chloramphenicol(C), imipenem(IPM), trimethoprim-sulfamethoxazole(S), vancomycin(Va), tetracycline(Te), ciprofloxacin(CIP)

Table 7. Genotypes and antibiotic susceptibility in *Str. uberis*

Genotype(PFGE)	Drug susceptibility*	
	Susceptible antibiotics	Disinfectant
a	C, CIP, IPM, S	L, F
c	AmC, SAM, IPM, S	L, F, B
d	AmC, SAM, IPM,	F, G, B
e	AmC, AM, C, CIP, IPM, S, Va	L, F, G, B
f	AmC, SAM, C, CM, IPM, S, Va	L, F, G, B
g	AmC, SAM, C, CIP, IPM, Te, S, Va	L, F, G, B

* amoxicillin-clavulanic acid (Am), ampicillin sulbactam(SAM), chloramphenicol (C), imipenem(IPM), trimethoprim-sulfamethoxazole(S), vancomycin (Va), tetracycline (Te), ciprofloxacin (CIP)
L: long life(1:250) F: Farmfluid(1:500) G: Germex(1:1000)
B: Betadin(1:10)

4. 고 찰

*Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus* spp.의 균주 수준에까지 동정하고 이들의 유전자형을 결정하는 것은 유방염 관리 및 치료와 소독에 의하여 유 생산환경에서 제거 및 퇴치에 있어서 중요한 의의를 갖는다. 적절한 type을 결정하고 이에 대한 항생제 저항성과 소독제 저항성에 관한 기초 data를 확보한 상태에서는 투약에 의한 치료를 하는 경우에는 물론 목장에서 소독작업도 적정하게 하는 기초가 될 것이다.

본 연구에서는 가장 이상적인 genotyping 방법으로 알려진바 있는 PFGE 방법에 의하여 주요 균주에 대한 typing을 시행하고 이들의 항생제 저항성 pattern과 소독제에 대한 저항성 data base를 확보하였으며 이를 보다 저렴하고 빠른 시일 내에 결과를 얻을 수 있는 대용방법을 고안한다는 면에서 RAPD에 의한 genotyping 방법과 비교 분석을 시도하였다.

병원균주와 주요 산업균주의 균주별 동정은 오랜 동안 지속되어온 주요과제로서 균주의 genotyping 분별능력이 우수한지 여부를 비교 검토하였고, 적정 primer를 고안하여 선정하는 과정에서 7개의 primer에 대한

RAPD 반응 시험에서 그 결과를 비교 검토하여 재현성이 우수한 것을 확인하였으며, 동일 균주에 대한 PFGE 및 RAPD pattern 형성도 동일한 성향의 pattern을 보이는 것이 확인되어, RAPD 방법을 이용한 genotyping 방법으로 사용 가능하다는 것으로 판단하게 되었다.

5. 결 론

유방염의 원인균인 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus* spp.의 genotyping 방법 중에서 PFGE 방법을 대체할 수 있는 신속 정확한 대체방법으로서 genotype의 판별능력과 적정 primer의 선택 및 재현성을 검토한 결과 RAPD 방법을 적용 할 수 있는 것으로 확인되었다. Genomic DNA purification kit를 이용하여 분리하고, 본 연구에서 고안된 KIKI primer(TGCACTGATG)를 사용하여 PCR을 수행하며, RAPD에 있어서의 cycler 조건은 최초 denaturation 93℃에서 3분 동안 수행하고 denaturation 93℃에서 1분, annealing 37℃에서 1분 및 extension 72℃에서 1분을 35회 반복하였고, 마지막 extension은 72℃에 4분간 수행한다. 전기영동은 1.5% agarose gel을 이용하여 100 voltage에서 2시간 수행하는 방법으로서 genotyping과 균주동정에 유효하게 활용될 수 있다.

현장활용도를 증진 방향으로서 대상 목장에서 나타나는 모든 유방염 원인균에 감수성을 나타내는 항생물질로서 제시된 것은 amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin sulbactam, chloramphenicol 이었다. 또한 *Streptococcus uberis*에서 genotyping을 통한 항생제 및 소독제 감수성 추적 예를 제시하여 genotyping을 통하여 특성을 신속히 탐지하는 방법을 예시하였다.

제 5 절 인용문헌

1. Batish, V. K., and Harish Chander. 1987. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and Their Preformed Enterotoxins in Frozen Dairy Products. Austrlian J. of Dairy Technology. March/June: 22-24.
2. Bautsch, W, D. Grothues, and B. Tummler. 1988. Genome fingerprinting of *pseudomonas aeruginosa* by two-dimensional field inversion gel electrophoresis. Fems Microbiol. Lett. 52: 255-258.
3. Bourgeois, P. L., M. Lautier, and P. Ritzenthaler. 1993. Chormosome mapping in lactic acid bacteria. Fems Microbiol. Rev. 12: 109-124.
4. Cassandra, L. S., and G. Condemine. 1990. New approaches for physical mapping of small genomes. J. Bacteriol. 172: 1167-1172.
5. Charles, R. C., L. S. Cassandra, K. M. Mathew. 1988. Pulse-Field Gel Electrophoresis of very large DNA Molecules. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17: 287-304.
6. Dingwall, A., L. Shapiro, and B. Ely. 1990. Analysis of bacterial genome organization and replication using pulsed-field gel electrophoresis. Methods Companion Mehtods Enzymol. 1: 160-168.
7. Dunsmore, D. G., and Co Nuzum. 1977. Iodophors and Iodine in Dairy Products: 2. Udder Washes and Salves. Austrlian J. of Dairy Technology. March: 42-44.
8. Eberhart, R. J., P. L. Levan, and L. C. Griel. JR. 1983. Germicidal Teat Dip in a Herd with Low Prevalence of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* Mastitis. J. Dairy Sci. 66: 1390-1395.
9. Fred, C. T., B. D. Nancy, 1995. Eradication of Endemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections from a Neonatal Intensive Care Unit. J. Infectious. diseases 171: 614-624.
10. Fred, C. T., D. A. Robert, A. Gordon, B. James, B. Sean, 1194. Comparision of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clinical Microbiology. Vol. 32. No. : 407-415.

11. Fred, C. T., D. A. Robert, V. G. Richard, A. M. Patrcia, 1995. Interprinting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed Field Gel Electrophoresis : Criteria for Bacterial Strains Typing. J. Clinical Microbiology. Vol. 33 No. 9: 2233-2239.
12. Goering, R. V., and M. A. Winters. 1992. Rapid Method for Epidemiological Evaluation of Gram-Positive Cocci by Field Inversion Gel Electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 30. No. 3. p. 577-580.
13. Göran Hedin and Anna Braeus. 1991. Screening tests for the detection of methicillin resistance in *Staphylcoccus epidermidis*. J. of Antimicrobial Chemotherapy. 28: 681-694.
14. Jung, C. H. and H, J, Kang. 1993. Antimicrobial Susceptibilties and β-lactamase Production of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bulk Milk and Domestic Animals. Kor. J. Vet. Publ. Hlth., Vol. 17. No. 3: 281-293.
15. Jeffrey, L. W, 1988 Characterization and Identification of Streptococci Isolated from Bovine Mammary Glands. J. Dairy sci 71: 1616-1624.
16. John, B., and Frank, H. D. 1984. Reviews of the progress of Dairy Science: Mastitis control-progress and prospects. Journal of Dairy Research. 51: 481-512.
17. Kang, H. J., H. G. Choe and W. G. Son. 1990. Incidence and Characterization of Coagulase-Positive *Staphylococcus aureus* in Bulk Milk from Dairy Farms. Kor. J. Vet. Publ. Hlth., Vol. 14. No. 1: 9-13.
18. Kang, H. J., H. G. Choe and W. G. Son. 1990. Production of Enterotoxin and Coagulse Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Milk. Kor. J. Vet. Publ. Hlth., Vol. 14. No. 1: 15-19.
19. Larry, G. R., W. S. Charles, and L. Barth Reller. 1981. Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations of 44 Antimicrobial Agents Against Three Standard Control Strains in Broth with and Without Human Serum. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 19. No. 6. p. 1050-1055.
20. Lefevre, J. C., G. Faucon, A. M. Sicard, and A. M. Gasc. 1993. DNA Fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Journal of Clinical

Microbiology. Vol. 31. No. 10. p. 2724-2728.

21. Louie, M., L. Louie, G. Papia, J. Talbot, M. Lovgren, and A. E. Simor. 1999. The Journal of Infectious Diseases. Molecular Analysis of the Genetic Variation among Penicillin-Susceptible and Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Serotypes in Canada. The Journal of Infectious Diseases 179: 892-900
22. Manuel, E. G., V. S. Kavindra, J. B. Carol, and E. M. Barbara. 1993. Typing of Group B Streptococci: Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Conventional Electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 31. p. 1430-1434.
23. Masud, T., A. M. Ali and M. A. Shah. 1993. Enterotoxigenicity OF *Staphylococcus aureus* Isolated from Dairy Products. The Austrailian Journal of Dairy Technology, Volume 48-May.
24. Michel, G. B., and O. Marc. 1998. Prevent Antibiotic Resistance through Rapid Genotypic Identification of Bacteria and of Their Antibiotic Resistance Gene in the Clinical Microbiology Laboratory. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 36. No. 8. p. 2169-2172.
25. Oliver, S. P., and B. A. Mitchell. 1983. Susceptibility of Bovine Mammary Gland to Infections During the Dry Period. J. Dairy Sci. 66: 1162-1166.
26. Owens, W. E., and J. L. Watts. 1987. Effects of Milk on Activity of Antimicrobics Against *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Udders. J. Dairy Sci. 70: 1946-1951.
27. Owens, W. E., J. L. Watts, R. L. Boddie, and S. C. Nickerson. 1988. Antibiotic Treatment of Mastitis: Comparison of Intramammary and Intramammary Plus Intramuscular Therapies. J. Dairy Sci. 71: 3143-3147.
28. Robert, W. H., B. C. Nancy, C. T. Fred, L. B. Tammy, D. Donna, R. Jillian, J. S. Pablo, and D. S. Jane. 1995. Eradication of Endemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections from a Neonatal Intensive Care Unit. The Journal of Infectious Diseases. 171: 614-24.
29. Romero, C. and I. Lopez-Goni. 1999. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of Brucella spp. by PCR. Applied and Environmental Microbiology,

Aug. Vol. 65. No. 8. p. 3735-3737.

30. Sheldrake, R. F., and R. J. T. Hoare. 1982. Post Milking Disinffects of Bovine Teats: Effects of Dipping Versus Spraying on Subclinical Mastitis, Atmospheric Iodine Concentration And Volume of Disinfectant Used. The Austrailian Journal of Dairy Technology-September.
31. Stephan, R., H. Schraft, and F. Untermann. 1994. Characterization of *Bacillus licheniformis* with the RAPD technique (randomly amplified polymorphic DNA). Letters in Applied Microbiology. 18. 260-263.
32. Tammy, L. B., A. H. Gary, C. T. Fred, and J. M. Miller. 1995. Pulsed- Field Gel Electrophoresis as a Replacement for Bacteriophage Typing of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology. Mar. Vol. 33. p. 551-555.
33. Tanskanen, E. L., D. L. Tulloch, A. J. Hiller, and B. E. Davidson. 1990. Pulsed-field gel electrophoresis of *Sma* I digests of lactococcal genomic DNA, a novel methods of strain identification. Appl. Environ. Microbiol. 56:3105-3111.
34. Tynkkynen, S., R. Satokari, ,M. Sarrela, T. Mattila-Sandholm and M. Sayelin. Comparison of Ribotyping, Randomly Amplified polymorphic DNA Analysis and Pulsed Field Gel Electrophoresis in Typing of *Lactobacillus rhamnos* and *L. casei* strains. Appl. Environ. microbiol. 65: 3908-3914.
35. Davis W. C., M. Hamilton, W. Ferens, A. G. Bohach and Y. H. Park. 1996. Role of Staphylococcal Enterotoxin C in the Pathogenesis of Mastitis. Kor. J. Vet. Publ. Hlth., Vol. 20. No. 4:299-309.
36. Young, K. A., E. G. M. Power, and I. Phillips. 1994. RAPD typing of clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. Letter in Applied Microbiology. 18:86-89. 1.
37. Poyart, C., C. Pierce, G. Quesne B. Pron, P. Berche, and P. Trieu-Cuot, 1997. Emergence of vancomycin resistance in the genus Streptococcus; Characterization of vanB transferable determinant in streptococcus bovis Antimicrob. Agents Chemother. 41:24-29
38. Willet, F., M. Roussel-Delvallez and R. Courcol. 1996. Choice of

a routine method for detecting methicillin-resistance in staphylococci. J. Antimicrob. chemotherapy. 37: 901-909

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 보고서 입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.