韓國臨床獸醫學會誌 第5卷 第2號
J. Korean Soc. Vet. Clin. Med.
Vol. 5, No. 2, December, 1988.

牛乳汁中에서 乳房炎 細菌에 대한 EDTA-Tris와 抗生劑併用의 抗菌效果

崔 準 杓·韓 弘 栗

서울大學校 獸醫科大學

緖 論

乳牛의 乳房炎 치료에 사용하는 각종 항생제의 抗菌效果는 乳汁內에서 일반적으로 불량하다. 유즙내에는 Ca^{++}과 Mg^{++} 등의 二價陽이온이 과량함유되어 있어 항생제의 항균효과에 영향을 미치며 특히 gentamicin과 oxytetracycline은 이들 이온의 함량과 pH농도에 따라 항균효과가 다르다.[15,23]

EDTA(2Na-ethylenedinitrotetraacetic acid)는 二價陽이온과 킬레이트하고 Gram음성세균의 菌體 表面構造를 손상시키며,[17] Tris는 이와같은 EDTA의 작용을 강화시켜,[9] 細菌細胞外液의 세포내 침투와 細胞外液의 방출이 증가되도록 하여[12] 라이소자임이나 살균제 및 항생제에 대한 세균의 감수성을 증가시킨다고 보고된 바 있다.[5,14,18]

임상적인 측면에서 EDTA-Tris 응용에 관하여는 개에 있어서 Wooley 등[21]이 실험적으로 *Pseudomonas aeruginosa*균을 주입하여 일으킨 膀胱炎, Blue 등[4] *Pseudomonas spp.*에 의한 外耳炎, Wooly 등[23]의 鼻炎, Bjorling과 Wooley[2]의 多發性 瘻孔症, Wooley 등[22]의 개와 고양이의 *Proteus*에 의한 子宮炎 그리고 토끼에 있어서는 Brown과 Richards[5] 및 Wilson[20]의 *Pseudomonas*성 角膜炎 치료에 등이 있다. 인체에서는 Gram음성세균 감염에 대한 만성적인 膀胱炎 치료를 시도한 Goldschmidt와 Wyss[9]의 임상보고에가 있다. 乳牛의 乳房炎에 관하여는 처음으로 韓[10]이 難治性인 急性乳房炎 原因菌인 Gram음성세균에 대하여 tetracycline과 EDTA-Tris를 병용 처리하였을 때 그 抗菌力이 탁월하게 상승하였음을 입증한바 있다.

현재 국내에서 사용되고 있는 乳房炎 치료용의 항생제중에서 각종 乳房炎原因菌에 대한 gentamicin의 실험실내 감수성율은 탁월하지만 실제 임상적 치료효율은 예상외로 불량하다. 미국의 경우에도 시험관내 감수성율은 90% 이상이지만 실제로 유방내로 주입하였을 경우의 치료효과는 50%미만이라고 보고된 바 있다.[7]

이와같은 항생제의 抗菌力이 牛乳汁內에서도 양호한 상태로 유지될 수 있도록 하는것은 큰 과제가 되어 있다. 저자는 야외치료시험에서 EDTA-Tris를 oxytetracycline 또는 gentamicin과 각각 병용 투여할 때 젖소의 乳房炎 治療反應이 현저하게 호전되었던 경험을 토대로 하여 실험실적으로 이를 규명하고저 각종 乳房炎 原因菌에 대한 이들 약제의 相互作用을 牛乳汁內에서 알아보았다.

材料 및 方法

試驗細菌：乳牛의 급성임상형 유방염 유즙에서 분리한 *Escherichia coli*(SNUM 86213), *Salmonella dublin*(SNUM 86182), *Proteus* spp.(SNUM 86103), *Pseudomonas aeruginosa*(SNUM 86167), *Staphylococcus aureus*(SNUM 86104), *Streptococcus agalactiae*(SNUM 86151) 및 *Corynebacterium pyogenes*

(SNUM 86070)菌을 이 실험에 사용하였다. 이들 7種의 세균가운데 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus agalactiae*는 oxytetracycline과 gentamicin에 대하여 감수성 균주이며 *Corynebacterium pyogenes, Pseudomonas aeruginosa* 및 *Proteus* spp.는 내성균주이다. *Escherichia coli, Salmonella dublin*은 oxytetracycline에는 저항성균주이었고, gentamicin에 대하여는 감수성 균주이었다.

供試藥劑:항생제는 gentamicin sulfate(658μg/mg,東明)와 oxytetracycline hydrochloride (926mg/gm,Pfizer)를 그리고 EDTA(2Na-ethylenediaminetetraacetic acid)와 Tris(tris (hydroxymethyl)amino methane)는 Fluka AG, Buchs, Switzerland의 일급시약을 사용하였다.

EDTA(pH 8.0)는 1M,Tris는 0.05M의 stock 용액을 사용하였다. 각종 시험약제의 표준원액 제조 및 희석방법 그리고 농도별 약제와 배지의 혼합방법은 Ericsson과 Sherris[8]의 "Report of an international collaborative study on antibiotic sensitivity testing"에 준하였다.

使用培地：항균실험용배지는 건강한 Holstein-Friesian종의 정상유즙으로써 호기성 및 혐기성 세균배양검사에서 무균이고 California Mastitis test에서 음성, Milkoscan에서 락토스 4.76%, 유단백 3.12%, 유지방 3.73% 그리고 칼슘 125.2mg/100ml, 마그네슘 12.0mg/100ml이 함유된 것을 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 고형배지로서는 brain heart infusion agar (BHIA, Difco Co.USA)를 사용하였다.

最小發育抑制濃度測定:7종의 供試細菌에 대한 gentamicin, oxytetracycline 및 EDTA—Tris의 최소발육억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)의 측정은 Blair 등[3]의 방법에 준하여 시험관 희석법으로 그리고 Sabath[19]의 방법에 준하여 구한 isobologram像에 의하여 측정하였다.

細菌發育抑制活性度測定:EDTA-Tris와 각 공시약제의 복합제가 나타나는 유즙내에서의 세균발육억제활성도 (Bacterial inhibitory activity,BIA) 검사는 Sabath[19]의 방법에 준하여 2—dimensional Microtiter chessboard technique으로 실시하였다. 편평 저면형 96-cup microtiter plate를 사용하여 두 시험약액을 2배수 희석법으로 MIC基點에서부터 희석하여 0.05ml씩을 분주하고 1ml당 10^6 CFU의 供試菌 0.05ml씩을 균일하게 분주하였다. 이때 시험약액을 첨가하지 아니한것을 대조군으로 매 plate마다 동일한 방법으로 처리하여 비교하였다. 프라스틱 덮개를 덮고 37℃에서 24~48시간 배양한 후에 각 0.01ml씩 취하여 BHIA에 접종하고 37℃에서 24시간 배양한후 집락의 형성유무로서 결과를 판정하였다. 결과판정에서 항균효과에 따라 상승작용, 상가작용 및 길항작용의 여부를 결정하는 isobologram을 Sabath[19]의 방법에 준하여 작성하고 이 isobologram像의 graph라인이 기점으로부터 원위곡선을 나타내면 길항작용으로, 일직선은 상가작용으로 그리고 근위곡선은 상승작용이 있다고 판정하였다.

動力學的殺菌曲線測定：동력학적살균곡선(Kinetic-killing curve,KKC)의 측정은 두가지 약제의 병용으로 상승작용이 인정된 시험약제에 한하여 Wooley 등[22]의 방법에 준하여 실험하였다. 각군마다 총량이 10ml가 되도록 다음의 4가지 시험군에 최종균농도가 10^6 CFU/ml인 균액을 추가분주하였다. 즉, ① 순수한 대조용 유즙군, ② gentamicin 또는 oxytetracycline 1/4 MIC를 함유한 유즙군, ③ EDTA-Tris(0.05M)의 1/4MIC를 함유한 유즙군, ④ gentamicin과 EDTA-Tris(0.05M) 또는 oxytetracycline과 EDTA-Tris(0.05M) 각의 1/4MIC를 함유한 유즙군이었다.

이들 4군의 시험용액은 동시에 동일한 균주를 각각 접종한 다음 37℃ 항온수조에서 배양하면서 시간별로 0, 2, 4, 6, 8 및 24시간에 0.1ml씩을 취하여 BHIA상에 유리봉으로 도말접종하여 37℃에서 24시간 배양하였으며 1ml당 CFU측정은 Wooley 등[22]의 방법에 준하였다.

結　果

항균제에 대한 감수성 실험에서 얻은 유즙내에서의 최소발육억제농도(MIC)는 Table 1과 같다. *Staphylococcus aureus* 및 *Streptococcus agalactiae*는 oxytetracycline에 대한 MIC가 4μg/ml이하이었으며 다른 5종의 세균에 대한 MIC

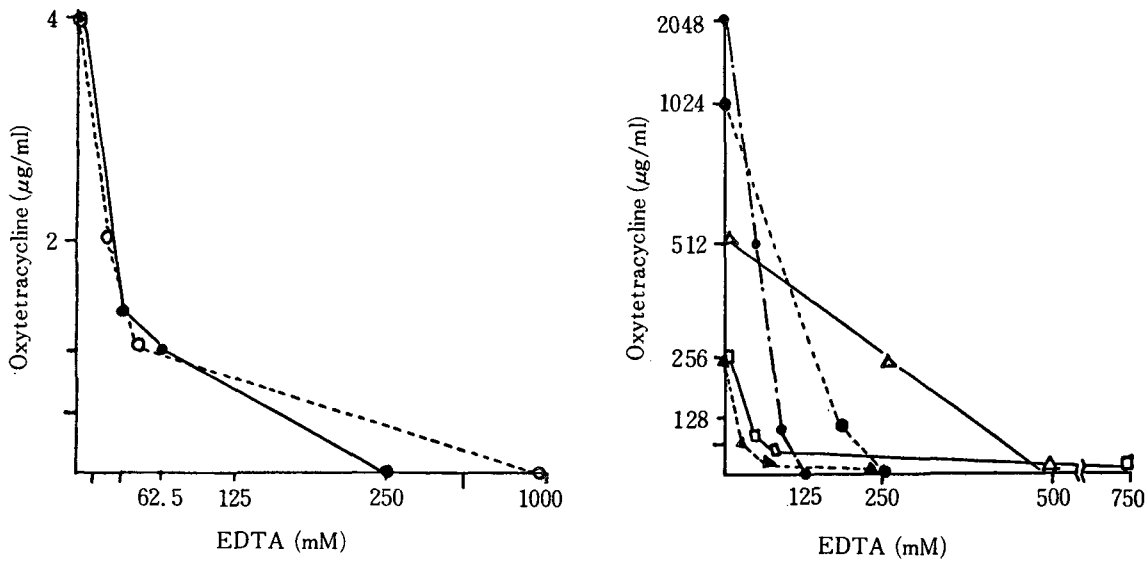

Fig. 1. Isobologram in bovine milk, illustrating the combined effect of EDTA-Tris and oxytetracycline on *Staphylococcus aureus* (-●—●-) *Streptococcus agalactiae* (···○···○···), *Corynebacterium pyogenes* (-△-△-), *Escherichia coli* (●—●), *Pseudomonas aeruginosa* (-●···●-), *Proteus* spp. (-□—□-) and *Salmonella dublin* (▲···▲).

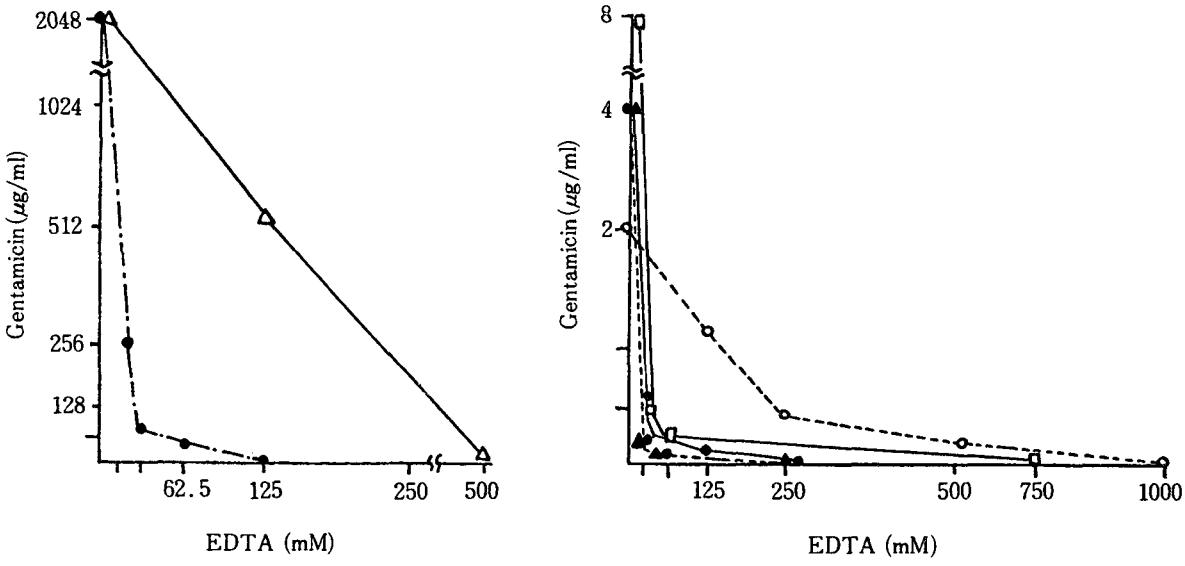

Fig. 2. Isobologram in bovine milk, illustrating the combined effect of EDTA-Tris and gentamicin on *Staphylococcus aureus* (●—●), *Streptococcus agalactiae* (⊙···⊙), *Corynebacterium pyogenes* (△—△), *Escherichia coli* (●···●), *Pseudomonas aeruginosa* (●···●), *Proteus* spp. (⊟—⊟) and *Salmonella dublin* (▲···▲).

는 256㎍/ml이상이었다.

*Corynebacterium pyogenes, Pseudomonas aeruginosa*에 대한 gentamicin의 MIC는 각 2048 ㎍/ml이었으며 *Proteus* spp.의 MIC는 8㎍/ml, *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella dublin*의 MIC는 4㎍/ml이었고, *Streptococcus agalactiae*의 MIC는 2㎍/ml이었다. EDTA-Tris의 MIC는 *Streptococcus agalactiae*에서 1000mM로 가장 높았으며 *Proteus* spp.에서 750mM, *Corynebacterium pyogenes*는 500mM, *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* 및 *Salmonella dublin*은 250mM이었으며 *Pseudomonas aeruginosa*에서 125mM로 가장 낮았다.

Oxytetracycline과 EDTA-Tris(0.05M)복합제 및 gentamicin과 EDTA-Tris(0.05M)복합제가 7종의 사용균주와 牛乳汁內에서 배양되었을 때 상승작용이 있는가를 알아보기 의하여 2-dimensional Microtiter chessboard techinique으로 상호작용을 측정하였던 바 그 성적은 Fig 1,2와 같다.

이들 복합제는 *Corynebacterium pyogenes*를 제외한 다른 균주에 대하여 상승작용이 있었다. 혼합약제의 공시균주에 대한 상승효과의 결과는 동력학적살균곡선을 통하여서도 일치하였으며 그 성적은 Fig 3~5와 같다.

EDTA-Tris의 1/4MIC, gentamicin의 1/4MIC, EDTA-Tris 1/4MIC와 gentamicin 1/4MIC복합제, oxytetracycline의 1/4MIC 그리고 EDTA-Tris 1/4MIC와 oxytetracycline 1/4MIC복합제가 각 공시세균과 반응했을때 1ml당 CFU는 *Staphylococcus aureus*에서 *8-log, 9-log, 11-log, 9-log, 10-log*로 감소하였고, *Streptococcus agalactiae*에서는 *2-log, 2-log, 10-log, 3-log, 5-log, Pseudomonas aeruginosa*는 *9-log, 2-log, 10-log, 9-log, 11-log, Proteus* spp.는 *3-log, 3-log, 11-log, 2-log, 4-log* 로, *Escherichia coli*는 *2-log, 3-log, 10-log, 5-log, 11-log*, 로 그리고 *Salmonella dublin*은 *2-log, 3-log, 9-log, 6-log, 7-log*, 까지 감소하였다.

이와같이 EDTA-Tris 및 항생제의 병용으로 항균작용의 상승효과가 뚜렷한 것으로 나타났으며 *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Proteus* spp., *Salmonella dublin*에서는 EDTA-Tris와 grntamicin을 병용했을 때가 oxytetracycline과 병용했을 때 보다 효과가 컸으며 *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*에서는 EDTA-Tris를 oxytetracycline과 병용했을 때 효과가 컸다.

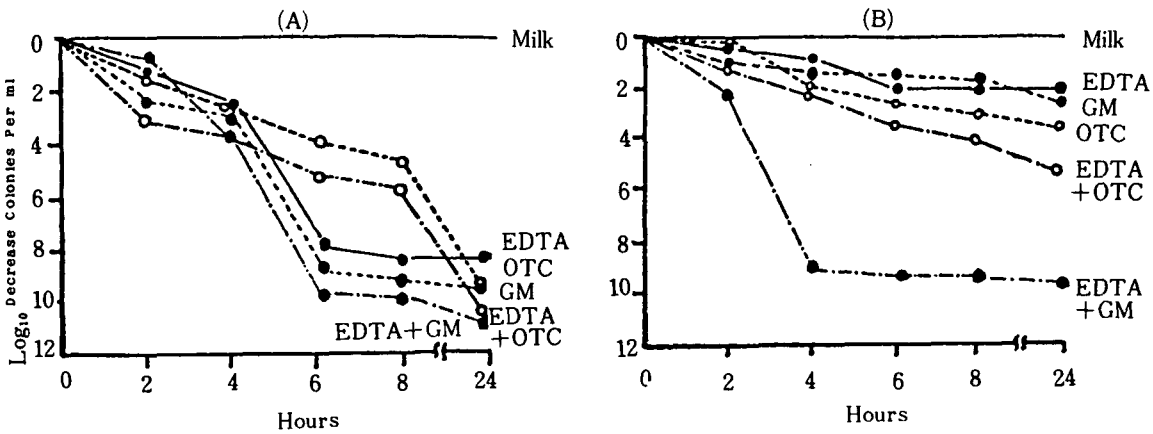

Fig. 3. Kinetic-killing curve in normal bovine milk, illustrating the combined effect of EDTA-Tris and oxytetracycline(OTC), EDTA-Tris and gentamicin(GM) on antibiotic-sensitive strains of *Staphlococcus aureus* (A) and *Streptococcus agalactiae* (B).

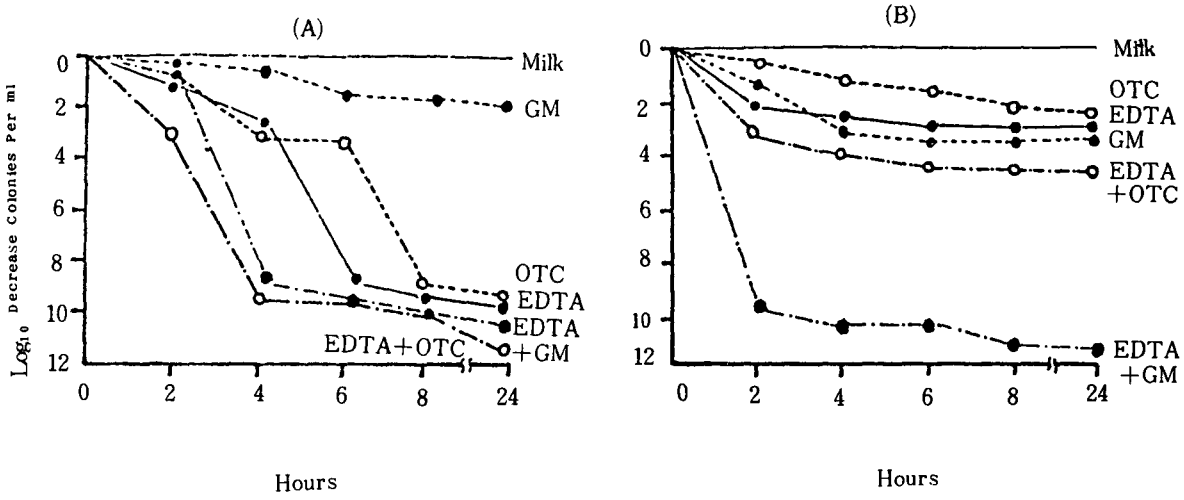

Fig. 4. Kinetic-killing curve in normal bovine milk, illustrating the combined effect of EDTA-Tris and oxytetracycline(OTC), EDTA-Tris and gentamicin(GM) on antibiotic-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*(A) and *Proteus* spp. (B).

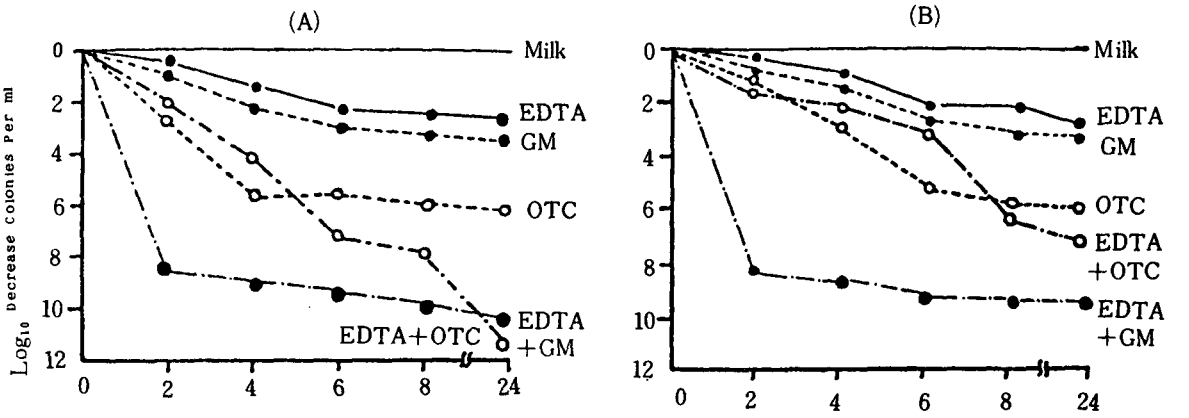

Fig. 5. Kinetic-killing curve in normal bovine milk, illustrating the combined effect of EDTA-Tris and oxytetracycline(OTC), EDTA-Tris and gentamicin(GM) on OTC-resistant and GM-sensitive strains of *Escherichia coli*(A) and *Salmonella dublin*(B).

Table 1. Minimal Inhibitory Concentration of Oxytetracycline, Gentamicin and EDTA-Tris for Bovine Mastitis Pathogens in Normal Bovine Milk

Test microorganisms	Oxytetracycline (μg/ml)	Gentamicin (μg/ml)	EDTA-Tris (mM)
Staphylococcus aureus	4	4	250
Streptococcus agalactiae	2	2	1,000
Corynebacterium pyogenes	512	2,048	500
Escherichia coli	1,024	4	250
Pseudomonas aeruginosa	2,048	2,048	125
Proteus spp.	256	8	750
Salmonella dublin	256	4	250

考 察

乳汁內에서 나타나는 항생제의 抗菌力은 유즙내 함유되어 있는 Ca^{++},Mg^{++}과 같은 二價陽이온성물질, 乳脂肪 및 乳蛋白 등에 의해 영향을 받는다. 이와같은 항생제의 항균력 감소는 EDTA-Tris와 병용투여함으로써 상승됨이 본 실험에서 밝혀졌다.

EDTA-Tris는 특히 Gram음성세균의 세포벽으로부터 lipopolysaccharide와 phospholipid를 유출시킴으로써 균체표면구조에 손상을 주는데 Gram음성세균의 세포벽에는 lipopolysaccharide와 phospholipid를 약 10~20% 함유하고 있는 반면 Gram양성세균은 불과 2%만을 함유하고 있어 Gram음성세균에 대한 항생제의 항균력을 증가시킨다고 하였다.[11,12] *E.coli*의 겨우는 EDTA의 작용하에서 細胞外膜의 lipopolysaccharide를 50%까지 상실한다고 보고된 바 있다.[1]

세균세포벽의 구조적인 통합성을 유지시켜 주는 peptidoglycan의 함유량 차이에 의해서도 EDTA-Tris가 미치는 영향이 Gram음·양성간에 차이가 있다. 즉 Gram양성세균은 세포벽의 건조중량 약 50%가 peptidoglycan인데 비하여 Gram음성세균은 10%이하를 함유하고 있다.[12] Gram양성세균일지라도 *Listeria monocytogenes*균과 같이 세포벽의 lipid함량비가 30~50%나 되는 경우에는[16] EDTA-Tris의 작용이 상승된다.[24] 또한 같은 Gram양성세균일지라도 세균세포의 陽이온성변화를 조절하는 teichoic acid함량이 적게 함유된 Gram양성세균은 항생제 단독투여 경우보다 EDTA-Tris와 함께 투여될 때 용이하게 사멸된다. 이 실험에서 oxytetracycline, gentamicin에 내성균주이었던 *Pseudomonas aeruginosa, Proteus* spp.균의 세균수가 1×10^{10} 이하로 감소함으로써 이들 항생제의 항균력이 EDTA-Tris에 의해서 크게 증가됨을 볼 수 있으며 또한 oxytetracycline에 내성균주이며 gentamicin 감수성 균주이었던 *E.coli, Salmonella dublin*균도 EDTA-Tris가 병용투여되었을 때 세균수가 1×10^{10} 이하로 감소함으로써 Mg^{++},Ca^{++}와 같은 저해인자가 존재하는 유즙내에서도 항균작용이 크게 증가됨을 보여주었다. 이와같은 실험결과는 韓[10]의 실험결과와도 일치하는 것으로서 乳汁內에서의 抗菌力을 상승시켜 유방염 치료에 널리 응용하고 있는 각종 항생제에 관한 상호작용이 비교 검토되어야 할 것이다.

gentamicin은 세균의 막성리보소옴에 작용하여 단백질합성을 방해함으로써 살균효과를 나타내며 유즙내에 다량 함유된 Mg^{++},Ca^{++}과 같은 二價陽이온은 세균세포벽에 달라 붙어 gentamicin이 균체표면에 결합되고 침투하는 것을 방해함으로써 gentamicin의 살균효과에 길항적으로 작용한다.[25]

oxytetracycline은 세균內 리보소옴단계에서의 단백질합성을 방해함으로써 정균작용이 나타나지만 그 耐藥性은 oxytetracycline에 내성인 Gram음성세균은 감수성균주보다 그 침투가 적게 허락될 뿐 아니라 세포질막을 가로질러 세포內로 침투하는 항생제의 이동을 막는 단백질을 추가적으로 생성하고 막성리보소옴의 결합부위를 차단

하는데 기인한다.[6] 그러나 병용투여하면 EDTA-Tris는 내성균주의 균체표면구조를 이완시켜 oxytetracycline의 침투력을 높여준다고 사료된다.

이 실험은 실제임상에서 유방염 치료목적으로 EDTA-Tris를 항생제와 함께 유방내로 주입하였을 때 유방염 치료효과가 항생제 단독투여시보다 현저하게 상승하였던 사실을 실험실적방법으로 그 기전을 입증한 것으로서 앞으로 실제적으로 임상에서 유방염치료에 크게 기여할 것으로 사료된다.

結 論

EDTA-Tris-gentamicin 또는 EDTA-Tris-oxytetracycline 복합제가 牛乳汁內에서 나타내는 항균작용을 알아보기 위하여 젖소의 急性乳房炎 乳汁에서 분리한 *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Corynebacterium pyogenes, Escherichia coli, Salmonella dublin, Pseudomonas aeruginosa* 및 *Proteus spp.*균에 대한 抗菌效果를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. EDTA-Tris, gentamicin 및 oxytetracycline은 *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli, Salmonella dublin, Pseudomonas aeruginosa* 및 *Proteus spp.*균에 대한 최소발육억제 농도가 현저하게 감소하였다.

2. EDTA-Tris-gentamicin 및 EDTA-Tris-oxytetracycline복합제는 *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli, Salmonella dublin, Pseudomonas aeruginosa* 및 *Proteus spp.*균에 대한 항균효과의 상승작용이 인정되었으며, *Corynebacterium pyogenes*균에 대하여는 상가작용이 인정되었다.

참 고 문 헌

1. Bayer, M.E. and Leive, L.: Effect of ethylenediaminetetra acetate upon the surface of *E.coil.* J. Bacteriol. (1977)130: 1364.
2. Bjorling, D.E. and Wooley, R.E.: EDTA–tromethamine lavage as on adjunct treatment for multiple fistulas in dog. J.A.V.M.A., (1982)181: 596.
3. Blair, J.E., Lennette, E.H. and Truant, J.P.: Mannual of clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Baltimore, Williams & Wilkins Co., (1970)p.307.
4. Blue, J.L., Wooley, R.E. and Eagon, R.G.: Treatment of experimently induced *Pseudomonas aeruginosa* otitis externa in the dog by lavage with EDTA–Tromethamine–lysozyme. Am. J. Vet. Res., (1974)35: 1221.
5. Brown, M.R.W. and Richads, R.M.E.: Effect of ethylenedia minetetraacetic acid on the resistant of *Pseudomonas aeruginosa* to antibacterial agents. Nature, (1965)207: 1391.
6. Dezeeuw, J.R.: Accumulation of tetracyclines by *Escherichia coli.* J. Bacteriol., (1968)95: 498.
7. Eberhart, R.J.: Coliform mastitis, *In Vet.* Clinics North. Am., (1984)6(2).
8. Ericsson, H.M. and Sherris, J.C.: Antibiotic sensitivity testing report of an international collaborative study. Acta. path. microbiol. scand., Suppl. (1971)217.
9. Goldschmidt, M.C. and Wyss, O. : The role of tris in EDTA toxicity and lysozyme lysis. J. Gen. Microbiol., (1967)47: 421.
10. Han, H.R.: Antibacterial effects of combinations of EDTA–Tris and Tetracycline hydrochloride on *Escherichia, Salmonella* and *Staphylococci* in normal bovine milk. Seoul Univ. J. Vet. Sci. (1986)11(1): 95.
11. Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A.: Handbook of microbiology. cleveland. Ohio, CRC Press Inc. (1973)pp.167～183.
12. Leive, L.: A nonspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1968)53: 745.
13. Leive, L., Shovlin, V.K. and Mergenhagen,

S.E.: Physical, chemical, and immunological properties of lipopolysaccharide released from *E. coli* by EDTA. J. Biol. Chem. (1986)243: 6384.
14. Monkhouse, D.C. and Graves, G.A.: The effect of EDTA on the resistance of *P. aeruginosa* to benzalkonium chloride. Aust. J. Pharmacol. (1967)48: 570.
15. Neumann, M.: Useful and harmful interactions of antibiotics. Boca Ration, Florida, CRC Press Inc. (1985)pp.126, 234~255.
16. Reaveley, D.A. and Burge, R.E.: Walls and membranes in bacteria. Adv. Microb. physiol. (1972)7: 1.
17. Roberts, N.A., Gray, G.W. and Wilkinson, S.C.: The bacterial action of ethylenediaminetetraacetic acid on *Pseudomonas aeruginosa*. Microbios. (1970)78: 189.
18. Russel, A.D.: Effect of magnesium ions and EDTA on the activity of vancomycin aganist *E. coli* and *S. aureus*. J. Appl. Bacteriol. (1979)30: 395.
19. Sabath, L.D.: Synergy of antibacterial substances by apparently known mechanisms. Antimicrob. Agents Chemother. (1967)210.
20. Wilson, L.A.: Chelatin in experimental *Pseudomonas* Keratitis. Br. J. Ophthalmol. (1970)54: 587.
21. Wooley, R.E., Schall, W.D., Eagon, R.G., et al.: Efficacy of EDTA-Tris-lysozyme lavage in the treatment of experimentally induced *Pseudomonas aeruginosa* cystitis in the dog. Am. J. Vet. Res. (1974)35: 27.
22. Wooley, R.E., Blue, J.L. and Campbell, L.M.: Attempted reversal of oxytetracycline resistance of *Proteus mirabilis* by EDTA-tromethamine lavage in experimentally induced canine and feline cystitis. Am. J. Vet. Res. (1975)36: 1533.
23. Wooley, R.E., Berman, A.P. and Shotts, E.B.: Antibiotic-trimethamine-EDTA lavage for the treatment of bacterial rhinitis in a dog. J.A.V.M.A., (1979)175: 817.
24. Wooley, R.E., Jones, M.S., Gilbert, J.P. and Shotts, E.B.: *In vitro* effect of combination of antimicrobial agents and EDTA-tromethamine on certain gram-positive bacteria. Am. J. Vet. Res. (1983)44: 2167.
25. Zimelis, V.M. and Jackson, G.G.: Activity of aminoglycoside aganist *Pseudomonas aeruginosa*: Specificity and site of calcium and magnesium antagonism. J. Infect. Dis. (1973)127: 663.

Combination Effects of EDTA-Tris and Antibiotics on Bovine Mastitis Pathogens in Bovine Milk

Jun-Pyo Choi, D.V.M., M.S and Hong-Ryul Han, D.V.M., Ph. D.
College of Veterinary Medicine, Seoul National University

Abstract

Combinations of EDTA-Tris and gentamicin, oxytetracycline in normal bovine milk were examined

for synergistic activities aganist *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Corynebacterium pyogenes, Escherichia coli, Salmonella dublin, Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus* spp. isolated from the milk of acute clinical bovine mastitis.

The results were summarized as follows:

1. The minimal inhibitory concentrations of EDTA–Tris and gentamicin, oxytetracycline on *Escherichia coli, Salmonella dublin, Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus agalactiae* were markedly reduced.
2. The significant synergistic effects observed when the microorganisms were reacted with EDTA–Tris and gentamicin, oxytetracycline. These findings were respectively verified by kinetic studies of microbial death, using one–fourth minimal inhibitory concentrations of EDTA–Tris, gentamicin, and oxytetracycline.