

Bioluminescence 반응에 의한 ATP 측정을 이용한 젖소 유방염 진단에 관한 연구

김태중 · 김종배 · 이승배 · 전용수
진국대학교 축산대학
(1989. 3. 2 접수)

Diagnostic test for bovine mastitis by the determination of ATP based on firefly bioluminescence

Tae-jong Kim, Jong-bae Kim, Seoung-bae Lee, Young-soo Jeon
College of Animal Husbandry, Kun Kuk University.
(Received Mar 2, 1989)

Abstract: This study was carried out to diagnostic test for bovine mastitis by the determination of adenosine triphosphate (ATP) based on firefly bioluminescence. The results obtained are follow;

1. The infection rate of bovine mastitis investigated with 521 cows in 47 dairy farms were found to be 3.6% of clinical form and 44.1% of subclinical form according to the degree of infection.
2. The light yield produced in firefly bioluminescence system was proportional to the concentration of ATP giving stright line within the range of 100PM~1uM.
3. When the number of somatic cell in milk was determined by the ATP assay and compared with three conventional methods such Fossomatic, California mastatic test (CMT), and rolling ball viscometer (RBV), it was shown that $r=0.92$ for Fossomatic, 0.63 for CMT and 0.7 for RBV.
4. The microorganisms causing mastitis were isolated *Staphylococcus sp.* (53.3%), *Streptococcus sp.* (17.9%), *Micrococcus sp.* (13.5%), Gram negative bacilli (6.3%), Gram positive bacilli (5.5%) and Yeast-like fungi (5.4%).
5. The endogeneous ATP levels of bacteria in a raw milk determined by the firefly bioluminescence system and compared with the results of the conventional methods. The correlation was 0.88 for raw milk.

Key words: bovine mastitis, ATP, bioluminescence.

서 론

최근 증가되고 있는 축산물의 소비와 함께 식품으로서의 우유의 가치는 높이 평가되고 있다. 또한 우유는 식생활에 있어서도 각종 영양소가 풍부하게 함유된 보편식품으로 널리 평가받고 있으나, 각종 이물이 침입

하여 오염받기 쉬운 약점을 가지고 있다. 특히 우리나라의 낙농업은 대부분 좁은 면적에서 다두사육하고 있고, 과다한 농후사료의 급여 및 사육환경의 비위생적 관리 등으로 젖소의 유방염 감염율은 선진국보다 높은 경향을 나타내고 있다.^{1,2,3}

유방염에 감염된 우유는 낙농가들에게 경제적인 손

이 논문은 한국과학재단의 1986년, 1987년도 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

실을 주는 것은 물론 감염된 우유를 섭취했을 때 공중 보건학적 문제를 가져온다. 그리고 유방염의 발생시 무분별한 약제 투여는 유방염 감염균이 약제 내성을 획득하게 되기 때문에 확실한 약제와 보조요법이 행하여지지 않는다면 임상치료면에서 심각한 문제를 일으키게 된다.

임상형 젖소 유방염인 경우에는 임상증상이 외부로 나타나기 때문에 치료와 관리에 많은 관심을 기울이고 있으나 외부로 나타나지 않는 준임상형 유방염은 임상형 유방염보다 15~40배 가량 감염 빈도가 높고 또한 감염기간도 길며 유량의 감소와 유질 저하를 초래할 뿐만 아니라 다른 건강한 젖소에 대해서도 전염원이 된다. 이와같은 준임상형 유방염은 진단 치료 및 예방의 중요성이 있음에도 불구하고 외부로 나타나지 않기 때문에 크게 중요성을 인식하지 못하고 있다. 따라서 준임상형 젖소 유방염의 신속한 진단과 관리 계획을 세울 경우 젖소 유방염으로 인한 경제적 손실을 현저히 감소시킬 수 있으리라고 생각된다. Pearson et al⁴은 젖소의 유방염을 진단하는 방법으로는 우유의 체세포 수를 측정하여 결정하는 것이 매우 가치있다고 보고하였다. 직접 우유의 체세포를 염색하여 관찰하는 현미경 검사법, 우유의 체세포에서 DNA를 응고시켜 우유의 점도를 관찰하는 CMT(California mastitis test)법, 우유의 점도를 기계로 측정하는 RBV(rolling ball viscometer)법과 우유 중의 염소량을 측정하는 전기전도법 등이 있으나, 이와같은 방법들은 준임상형 유방염을 측정하는데 예민한 방법이 못된다.

Zeidler et al⁵이 제안한 coulter count 방법과 Schmidt-Madson⁶이 고안한 fluore-opto-electronic cell count (FOECC)는 우유속의 체세포수를 신속하고 정확하게 측정할 수 있으나, 이들 방법들은 매우 고가의 장비를 사용하기 때문에 폭넓게 이용되기 어려운 실정이다.

Bossuyt⁷는 bioluminescence를 이용한 젖소의 유방염 진단에 관한 보고를 하였으며 최등⁸은 bioluminescence 반응을 이용하여 제육표면의 세균을, 한등⁹은 이 반응을 이용하여 우유 중에 존재하는 세균 수 측정에 관한 연구를 보고하였다.

따라서 본 연구는 bioluminescence 반응에 의하여 우유속에 존재하는 체세포수나 세균의 ATP를 간접적으로 측정함으로써 유방염 진단에 기초적 자료를 제공해 주고자 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

젖소 유방염 감염우 조사 : 경기도 일원의 목장을 방

문하여 젖소의 유방염 검사를 하였는데, 방법은 착유시 젖소의 유두를 alcohol면으로 3~4회 소독하고 전유(foremilk)의 유즙을 3~4회 저버린 후 일부는 CMT(California mastitis test)로 우유를 검사하고, 일부는 멸균된 채취병에 우유를 무균적으로 채취하여 냉장상자에 넣어 실험실로 운반해 실험에 이용하였다.

빛 측정과 ATP량 계산 : 시료와 luciferin-luciferase (Lumac, Denmark)를 혼합시킨 다음, 빛 측정기체인 luminometer (LKB, Wallac 1250, Finland)의 chamber에 cuvette를 넣고 10초간 빛의 양을 적분화시켜 relative light units(RLU)를 측정하였다. 여기에 10 μ l의 adenosine triphosphate(ATP) standard 용액을 첨가시켜 다시 증가된 RLU를 측정하였으며 시료의 ATP량의 계산은 다음과 같다.

ATP content in sample [M]=

$$\frac{C_T - B}{C_{S+T} - C_T} \times [ATP] \times \frac{\text{vol. of ATP}}{\text{vol. of sample in assay}} \times D.F.$$

C_T = Counts of total ATP in sample [mV/10sec.]

C_{S+T} = Counts after adding standard ATP to the sample [C_T]

[ATP] = Content of ATP standard

Vol. = volume

D.F. = Dilution factor

B = Background

우유의 체세포내에 ATP 측정 : cuvette(poly vial 12 \times 47mm)에 시료 10 μ l와 체세포 ATP 추출시약인 nucleotide release somatic cells (NRS) 10 μ l를 넣고 30초간 추출시킨 후 ATP 측정시약인 luciferin-luciferase (LUMIT PM: 1vial을 pH 7.75인 HEPES-magnesium bupper 5ml로 용해시킨 것) 100 μ l와 혼합시킨 다음 luminometer로 빛의 양을 다음과 같이 측정하였다.

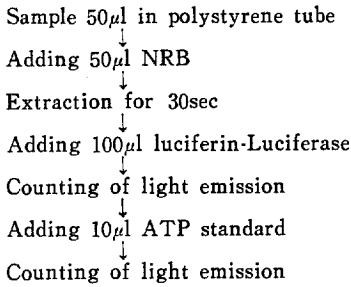
```

Pipeting sample 10 $\mu$ l in a polystyrene tube
↓
Adding 10 $\mu$ l NRB
↓
Waiting for 30sec
↓
Adding 100 $\mu$ l luciferin-luciferase
↓
Measuring of light yield
↓
Adding 10 $\mu$ l ATP standard
↓
Measuring of light yield
    
```

우유의 세균내에 ATP 측정 : 세균 배양액 50 μ l에 ATP 추출시약인 nucleotide release bacteria (NRB)

를 섞은 후 30초간 세균 ATP를 추출한 다음 ATP 측정시약인 luciferin-luciferase (Lumac, Denmark) 100 ml를 넣고 luminometer로 빛을 측정하였다.

Background는 NRB 대신 HEPES buffer 50ml를 넣은 cuvette에 luciferin-luciferase 100 μ l를 첨가한 후 측정된 것으로 하였으며, 모든 분석은 2회 반복 실시하였다. 세균내의 ATP는 총 ATP에서 세균의 ATP를 제거한 것으로 하였다.



California mastitis test(CMT): Schneider와 Jasper¹⁰ 방법에 의하여 실시하였으며 CMT 시약(한국동물약품) 2ml와 동량의 우유를 10초동안 혼합 후 우유의 응고에 따라 반응도를 측정하였다.

Electronic coulter counter에 의한 체세포 수 측정: 채취된 우유 sample을 somafix를 이용, 세포를 고정시킨 후, 정밀 측정장치인 coulter counter (Model 2M, Coulter Electronic Limited, England)를 사용하여 측정하였으며, 우유의 체세포를 전해질용액(NaCl)에 부유시켜 농도와 크기의 분포를 계속하기 위해 세포 전해부유액을 4초간 20 μ l을 빨아들임으로 측정하였다.

Fossomatic에 의한 체세포수 측정: 40°C water bath에 buffer fat를 녹인 우유 시료 0.5ml와 염색용액(0.1% ethidium bromide 26ml, 1% triton X-100 37.5ml를 25mM HOC₆ COOK와 20mM KOH buffer 2.5 liter에 섞은 것) 9.5ml를 혼합시켜 fossomatic 90의 chamber에 넣고 10초간 기다리며 형광물질인 ethidium bromide가 체세포의 DNA와 작용하여 나타낸 수치에 1,000배한 것을 체세포수로 하였다.

우유속의 총 세균수 측정: 우유를 채취하여 십진회석법으로 plate count agar (Difco, USA)에 0.1ml를 떨어뜨린 후 멸균 유리병으로 도말하여 37°C에서 48시간 배양 후 총 세균수를 측정하였고, *Staphylococcus*는 manitol agar (Difco, USA)를 이용하여 37°C에서 24~48시간 배양한 후 균수를 측정하였고, *Candida tropicalis*는 chloramphenicol (0.05mg/ml)과 cycloheximide (0.5mg/ml)가 함유된 Sabouraud's dextrose agar (Difco, U.S.A)를 이용하여 25°C에서 48~72시

간 배양 후 진균수를 측정하였다. 균수는 배양 후 나타난 colony수를 센 다음 희석 배수를 곱하여 생균수를 계산하였다.

젖소의 유방염 원인균 및 진균 분리: 감염된 젖소의 우유를 냉장상태에서 실험실로 가져와 asculin이 첨가된 5% 면양 혈액배지에 배양하여 각 배지상의 용혈상태, 염색성, catalase test, DNase test 등을 실시하여 원인균을 분리 동정하였다. 진균을 분리하기 위하여 Richard et al¹¹과 Moore와 Jaciow¹²의 방법에 따라 곰시유증을 chloramphenicol (0.05mg/ml)과 cycloheximide (0.5mg/ml)가 함유된 Sabouraud's dextrose agar (Difco, U.S.A)에 균등하게 도말하여 27±1°C에서 48시간 내지 7일간 배양하였다. 일차 배양된 균은 Gram 염색, lacto-phenol cotton blue 염색 및 필요에 따라서 slide culture를 실시하였다. 순수 배양된 진균은 API 20C auxano gramme kit (Appareile Procèdes Identification, France)를 사용하여 분리 동정하였다.

결과 및 고찰

젖소 유방염 감염우 조사: 목장에 있는 젖소의 유방염 감염율은 Table 1에서와 같이 47개 목장 총 521두의 젖소 중에서 249두(47.8%)가 양성으로 판정되었으며, 그 중 임상형은 19두로 3.6%였고, 준임상형 유방염은 230두로 44.1%로 나타났다.

박등³은 준임상형 감염율은 52.9%, 임상형은 2.8%로 보고하였으며, 유¹³는 준임상형이 53%, 임상형은 3.7%로 보고하였으며 석등¹⁴은 성환지방에서 임상형은 33.9%, 준임상형은 8.6%로 보고하였다. 이와같이 본 연구와의 감염율의 차이는 조사방법, 조사시기, 조사지역 등에 따라 다소 차이가 있기 때문이라고 생각되며 본 연구에서 나타난 준임상형 유방염의 감염율 44.1%의 결과는 외국에서 조사된 30% 수준보다는 높은 감염율을 나타냈다.

이는 아직까지 우리나라가 선진 외국에 비해 비위생적인 사양관리, 착유위생의 소홀 및 농후사료 과급 등의 문제를 가지고 있는 것으로 생각되기 때문에 유방염의 발생율을 격감시키기 위해서는 낙농가와 낙농생산업계에 유방염 방제의 중요성을 인식시켜 방제사업

Table 1. The infection rate of boine mastitis

| Dairy farms | No. of investigated cows | Infection rate | | Total |
|-------------|--------------------------|----------------|-------------|------------|
| | | clinical | subclinical | |
| 47 | 521 | 19(3.6%) | 230(44.1%) | 249(47.8%) |

을 지속적이고 체계적으로 실시하여야 할 것으로 생각된다.

Bioluminescence 반응에 의한 ATP 측정 : Bioluminescence 반응의 Kinetic 및 ATP 농도와 빛의 양과의 관계 : Luciferin-luciferase 용액에 일정량의 ATP를 첨가하였을 시 반응 kinetic은 Fig 1에 나타난 바와 같다.

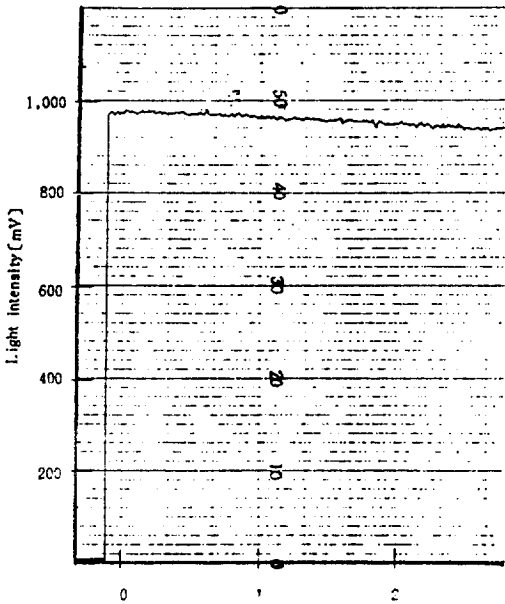


Fig 1. Kinetic of firefly bioluminescence reaction.

Luciferin-luciferase 용액은 ATP와 반응하여 즉시 빛이 발생되며 발생된 빛은 거의 일정한 수준을 유지하는 것을 볼 수 있다. 이런 현상은 McElory et al¹⁵에 의해 알려진 이후 Deluca와 McElory¹⁶는 ATP를 첨가후 빛이 0.25~0.3초 내에 발생된다고 하였으며, Wulff et al¹⁷에 의하면 생성된 빛은 20분 정도까지 일정한 수준으로 유지되나 약간의 기울기가 생기는 것은 반응 생성물과 luciferase가 비활성 복합체를 형성하는데 기인한다고 했다. 그러나 ATP 농도 측정시 생성된 빛의 양을 10초간 적분화시켜 측정하므로 약간의 기울기는 거의 문제가 되지 않는다고 사료된다(Fig 2).

ATP에 의해 생성된 빛과 ATP 농도와의 관계를 조사하기 위해 ATP 농도를 1 μ M~100pM까지 각각 달리하고 일정량의 luciferin-luciferase 용액을 첨가했을 때 나타난 결과는 Fig 3과 같다.

그림에서 보는 바와 같이 빛의 양과 ATP 농도 범위가 100pM에서 1 μ M까지 직선적으로 비례하는 것으로 볼 때 최소한 ATP 농도를 100pM까지 측정할 수 있

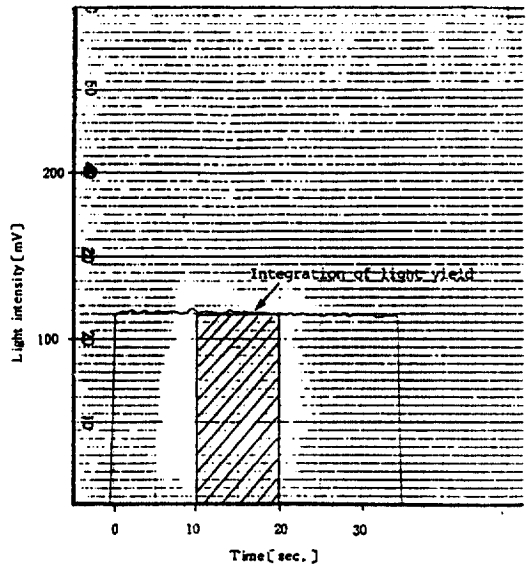


Fig 2. Measurement of light yield in firefly bioluminescence.

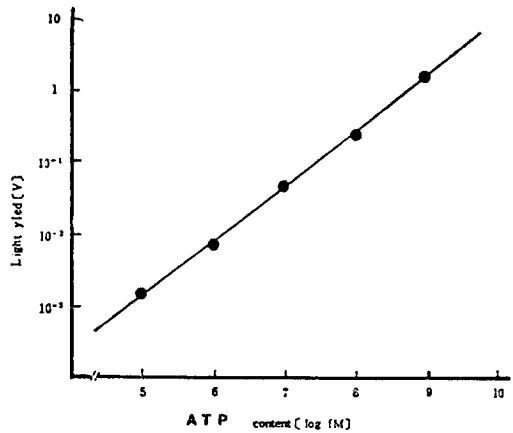


Fig 3. Relationship between ATP content and light yield in a firefly bioluminescence system.

다고 사료되며 이런 결과는 Chappell과 Levin¹⁸ 및 Ludin과 Thore¹⁹가 보고한 결과와 거의 일치하는 수준이다.

세균의 ATP 농도를 정량하기 위한 bioluminescence 반응 kinetic은 Fig 4에 나타난 바와 같이 세균 ATP를 측정후 luciferin-luciferase를 일정량 첨가하면 일차로 빛이 증가하여 75mV 수준을 나타내었다. 여기에 다시 internal standardization 방법에 따라 이미 정량된 standard ATP를 넣으면 다시 빛이 증가되어 195mV 수준으로 나타내는 것을 볼 수 있다.

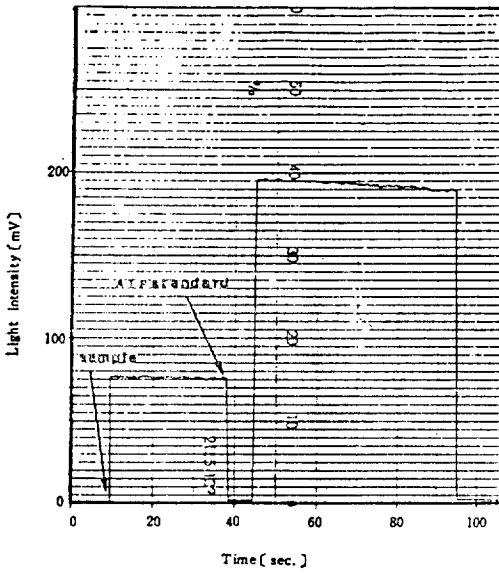


Fig 4. The time course of light emission of the bioluminescence reaction in a sample containing bacteria before and after adding standard ATP.

이와 같은 현상에 따라 세균내의 ATP 농도는 임의로 첨가된 standard ATP 농도에 의해 증가된 빛의 양을 기준으로 해서 산출해 낼 수 있다.

우유속의 체세포 ATP 측정시 생성된 빛의 반복성 조사 : 우유속의 체세포 ATP를 측정함에 있어서 측정 방법의 반복성을 조사하기 위하여 25ng의 ATP 용액과 체세포수가 각기 다른 3종류의 우유를 10회 반복해서 빛의 양을 측정한 결과 변이계수가 모두 6% 미만의 반복성을 나타내었다(Table 2).

Table 2에서 보는 바와 같이 25ng의 ATP 용액에서 생산된 빛의 양에 대한 변이계수가 3%로 나타난데 비해 체세포수가 각기 다른 3종류의 우유내에서 추출된 체세포 ATP로부터 발생된 빛의 양의 변이계수는 평균 5.3%로 다소 높게 나타났지만 이 정도의 변이수준은 우유내의 체세포 ATP를 측정하는 방법으로는 비교적 반복성이 양호한 것으로 사료된다.

우유속의 체세포수와 체세포 ATP 농도와의 관계 : 동일한 시료를 Fossomatic 방법에 의하여 체세포수를 측정하고 생물학적 발광반응에 의하여 체세포 ATP 농도를 측정해서 상호 비교하던 바 Fig 5에 나타난 결과와 같이 체세포수가 증가함에 따라 ATP 농도도 증가함을 보였으며, $r=0.92$ 의 좋은 상호관계를 나타내었다.

이와 같은 결과는 fluore-opto-electronic cell counter

Table 2. Repeatability of light production measurement

| Measurement No. | ATP solution (25ng) | Milk sample | | |
|-----------------|---------------------|-------------|------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 231.1 | 15.2 | 63.7 | 416.4 |
| 2 | 220.5 | 17.5 | 62.5 | 434.6 |
| 3 | 213.9 | 16.0 | 60.6 | 443.2 |
| 4 | 227.3 | 17.8 | 61.1 | 448.1 |
| 5 | 220.0 | 16.6 | 57.6 | 447.7 |
| 6 | 229.4 | 16.9 | 55.7 | 430.0 |
| 7 | 211.0 | 17.7 | 71.0 | 479.0 |
| 8 | 218.0 | 18.8 | 68.5 | 444.6 |
| 9 | 212.6 | 15.8 | 64.2 | 401.7 |
| 10 | 217.5 | 16.1 | 59.8 | 370.9 |
| Mean | 220.2 | 16.8 | 62.5 | 431.6 |
| S.D.* | 6.6 | 0.9 | 3.5 | 21.5 |
| C.V.(%)** | 3.0 | 5.35 | 5.6 | 4.9 |

* S.D. : Standard deviation

** C.V. : Coefficient of variation

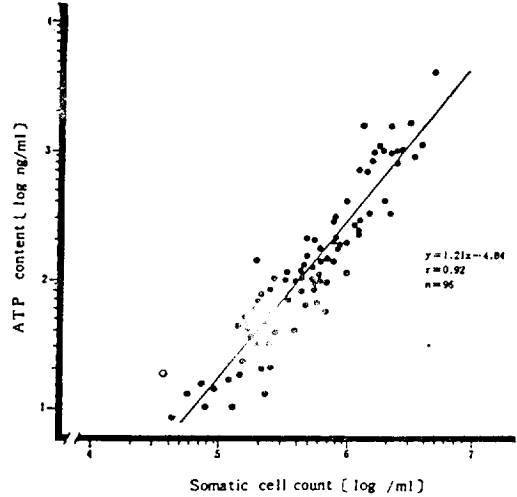


Fig 5. Relationship between the somatic cell ATP content and somatic cell count (Fossomatic) of milk samples.

(FOECC)와 microscopic count (MIC)와 비교하여 $r=0.97$ 을 보인 Schmidt-Madson⁶의 결과와 거의 비슷한 수준이나 FOECC과 NAGase 효소 측정과의 비교에서 $r=0.72$ 를 보인 Obara와 Komatsu²⁰의 결과 보다는 훨씬 좋은 상관을 나타내 주었다.

우유내의 체세포 ATP 농도, CMT 및 RBV 방법과의 상관관계 : 현재 일반적으로 사용되고 있는 상법들

Table 3. Correlations among various methods for the counting of somatic cells in mastitis milk

| Methods compared | | Correlation coefficient* |
|------------------|-----|--------------------------|
| ATP | RBV | 0.70 |
| RBV | CMT | 0.73 |
| CMT | ATP | 0.63 |

* $p < 0.01$

RBV : Rolling ball viscometer

CMT : California mastitis test

ATP : ATP measurement based on bioluminescence reaction

인 체세포의 DNA를 응고시켜서 점도를 관찰하는 CMT와 측정하는 RBV 방법들과 체세포 ATP 측정법과의 비교에서 Table 3과 같은 결과를 얻었다. 즉 동일한 시료 40개를 전기한 세가지 방법들로 측정했을 때 ATP 측정법과 RBV 법과의 비교에서 $r=0.7$, RBV와 CMT 법과는 $r=0.73$, CMT 법과 ATP 측정법은 $r=0.63$ 으로 대체로 낮은 상호관계를 나타내었다. Poultrrel과 Lerondelle²¹도 염소유에 존재하는 체세포수를 CMT법과 Fossomatic cell count법으로 비교하여 본 실험에서 얻은 결과와 비슷한 상호관계($r=0.71$)을 얻었고, 또한 현재 많이 사용되고 있는 CMT법 및 RBV법 사이에 $r=0.73$ 의 낮은 상호관계를 나타내었다. 따라서 이와 같은 낮은 상호관계는 ATP 측정법에서 야기되는 문제점보다는 비교된 CMT 및 RBV법이 체세포수를 정확히 측정할 수 있는 정량적인 방법이 아닌데서 비롯된 것이라고 생각된다.

Arnott²²의 보고에 의하면 bulk somatic cell count (BSCC)가 250,000cells/ml 보다 낮으면 목장내 준임상형 유방염이 매우 낮은 수준이며, 250,000~500,000 cells/ml이면 준임상형 상태가 중간수준이고, 500,000~750,000cells/ml이면 준임상형 유방염에 문제가 있으며, 750,000cells/ml 이상이면 문제가 심한 유방염의 상태라고 분류한 것을 기준으로 하여, 체세포 ATP 농도를 4가지의 준임상형 상태로 분류해 보면 ATP 농도가 60ng/ml 이하, 60~120ng/ml, 120~180ng/ml 및 180ng/ml 이상으로 구분할 수가 있다고 생각된다. 따라서 체세포 ATP를 측정하므로써 준임상형 유방염의 상태를 신속히 (5분내) 파악하는데 본 실험에서 사용된 체세포 ATP 측정방법이 충분히 이용될 수 있다고 사료되는 바이다.

유방염 원인균의 조사 : 유방염에 감염된 우유로부터 분리된 원인균은 Table 4에서 보는 바와 같이 *Staphylo-*

Table 4. Microorganism isolated from milk of bovine mastitis

| Microorganisms | Percent of isolants | |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------------|
| | clinical case (n=68) | subclinical case(n=652) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 14(20.6) | 113(17.3) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 12(17.6) | 250(38.3) |
| Other <i>staphylococcus</i> | 5(7.4) | 35(5.4) |
| <i>Micrococcus</i> spp. | 5(7.4) | 128(19.6) |
| <i>Streptococcus agalactia</i> | 4(5.9) | 18(2.8) |
| <i>Streptococcus uberis</i> | 2(2.9) | 42(6.4) |
| <i>Streptococcus dysgalactia</i> | 3(4.4) | 35(5.4) |
| Other <i>streptococcus</i> | 4(5.9) | 13(2.0) |
| <i>Corynebacterium</i> spp. | 5(7.4) | 3(0.5) |
| <i>Listeria</i> spp. | 2(2.9) | 1(0.2) |
| <i>E coli</i> | 4(5.9) | 1(0.2) |
| <i>Klebsiella</i> spp. | 2(2.9) | 1(0.2) |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | 2(2.9) | 3(0.5) |
| Yeast-like fungi | 4(5.9) | 9(1.4) |

n : Number of strains

occus aureus (*St aureus*)가 임상형, 준임상형 유방염에서 각각 20.6%, 17.3%로 높은 분리율을 보였고 *E coli*와 *Corynebacterium sp.*는 임상형에서는 각각 7.4%, 5.9%의 감염율을 보이고 있으나 준임상형에서는 0.5% 이하의 낮은 감염율을 나타내었다.

반면에 *St epidermidis*와 *Micrococcus*에서는 임상형에서 17.6%의 비교적 가벼운 감염율을 나타냈으나 준임상형에서는 38.3%와 19.6%로 높은 감염율을 나타내었다. 한편 효모양 진균류는 임상형에서는 5.9%로 나타난 반면 준임상형에서는 1.4%가 나타났으며, 분리균주는 *Candida krusei* 5주, *Candida tropicalis* 3주, *Candida pseudotropicalis* 2주, *Candia albicans* 2주가 분리되었다. 김과 박²은 젖소 유방염에서 분리된 세균중 *Staphylococcus*에 의한 임상형, 준임상형 유방염은 각각 21.4%, 26.9%로 보고하여 본 성적과 약간의 차이를 보이고 있으나, 반면 *St epidermidis*와 *Micrococcus*에서는 임상형에서 18.0%와 8.4%, 준임상형에서는 35.8%와 17.8%로 나타나 본 성적과 비슷한 경향을 보이고 있다. 또한 김과 한¹은 *St epidermidis*에 의한 유방염의 감염율은 43.3%, *St aureus*는 17.9%, *Micrococcus*는 12.7%라고 보고하여 본 성적과는 약간의 차이를 보이고 있다.

젖소의 유방염을 일으키는 진균에 관하여 본 연구에서는 임상형 유방염에서 5.9%, 준임상형 유방염에서

1.4%의 분리율을 보였다. 여와 최²³은 임상형 유방염이 걸린 젖소의 유즙에서 진균에 의한 것이 1.3%의 감염율을 보였으며 잠재성 유방염에서는 1.5%의 감염율이 나타났다고 보고하였다. 김과 박²은 임상형 유방염에서 12.3%, 준임상형 유방염에서 0.4%의 감염율이 있다고 보고하였고 장과 김²⁴은 진균에 의하여 발병되는 유방염 감염율은 9.6%라고 보고하였다. 이와 같이 젖소의 유방염을 일으키는 감염 미생물의 분리율은 연구자마다 다소 차이가 있는데, 이는 젖소의 유방염을 일으키는 감염 미생물이 지역별 분포가 다르며, 또한 숙주 자체의 저항성 및 분리동정방법 등의 차이 때문이라고 생각된다.

우유내에 있는 세균수와 ATP 농도와의 관계: 일반적으로 목장에서부터 수집된 우유는 세균의 오염 정도를 정확히 조사하기 위해 total colony count 법에 의해서 세균수가 측정되어진다. 그러나 colony 수를 조사하기 위해서는 세균을 배지에 접종시킨 후 최소한 2일 정도 배양시켜야만 그 결과를 알 수 있다. 그래서 이와 같은 문제점을 보완 해결할 수 있는 신속하고 간편한 방법 개발이 매우 절실히 요구되어져 왔다.

따라서 본 연구에서는 원유의 세균 오염 정도를 생물학적 발광반응의 원리에 의해 측정하여 그 이용 가능성을 조사코자 원유에 오염되어 있는 세균 수와 세균 ATP 농도를 생물학적 발광반응으로 측정하여 상호관계를 조사하였던 바 Fig 6과 같은 결과 ($Y=0.67X+3.39$, $r=0.88$)를 얻었다.

나타난 결과와 같이 수집된 원유에 오염되어 있는 세균수는 대부분 $10^5 \sim 10^8$ cfu/ml의 범위였으며, 이때 세균에서 유출된 ATP 농도는 $10^6 \sim 10^9$ fM으로 나타났고, 상호 88%의 상관관계를 보여주었다. William²⁵은 plate count법으로 측정했을 때 5.2×10^7 cfu/ml로서 매우 심한 차이가 생긴다고 보고하였다. 그러나 Bos-suyt²⁶와 Waes et al²⁷은 일반적으로 원유내에는 10^5 cell/ml 정도의 체세포가 존재하기 때문에 ATP를 정확하게 측정하기 위해서는 이와 같은 체세포의 ATP를 제거하지 않으면 세균수를 과대측정(overestimate)할 위험이 있어 세균 ATP를 측정하기 전 NRS와 ATPase를 사용해서 체세포 ATP를 제거 후 측정한 결과 상호 좋은 상관관계를 얻을 수 있었다고 보고하였다. 본 실험에서 얻은 88%의 높은 상관관계도 ATPase를 이용한 가수분해방법으로 먼저 체세포 ATP를 제거한 다음 세균 ATP 농도를 측정했기 때문이라고 사료된다.

따라서 본 실험에서 지시한 세균 ATP 측정방법을 이용할 경우 1시간내에 세균수를 파악할 수 있을 뿐만

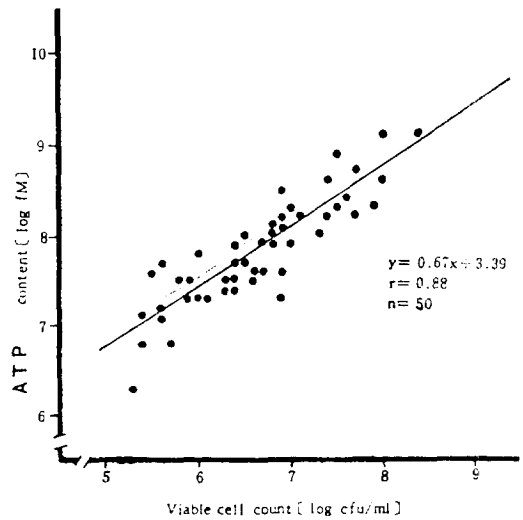


Fig 6. Relationship between microbial ATP content and viable cell count of microorganism on raw milk.

아니라 자동화시킬 수 있는 가능성이 있기 때문에 원유를 등급화 할 경우 신속한 세균 수 측정방법으로 폭넓은 응용이 기대된다.

결론

본 연구는 bioluminescence 반응에 의하여 우유속의 체세포, 우유세균의 ATP를 측정함으로써 유방염 진단에 관한 연구를 실시하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 47개 목장의 521두를 대상으로 조사한 젖소의 개체별 유방염 감염율은 임상형이 3.6%이었고 준임상형이 44.1%로 나타났다.
2. Firefly luciferase를 이용한 생물학적 발광반응에서 ATP 농도가 100pM에서 1uM까지 증가함에 따라 발생된 빛의 양도 비례적으로 증가하였다.
3. 유방염 진단시 생물학적 발광반응에 의한 ATP 측정의 이용 가능성을 조사하고자 유방염 우유에 존재하는 체세포수를 Fossomatic 방법, CMT 및 rolling ball viscometer(RBV) 법으로 측정하여 ATP 측정법과 상호 비교하였던 바 각각 $r=0.92$, 0.63 및 0.7의 상호관계를 나타내었다.
4. 젖소 유방염 원인의 주요세균은 *Staphylococcus* sp.가 53.3%, *Streptococcus* sp.가 17.9%, *Micrococcus* sp.가 13.5%, Gram 음성 간균이 6.3%, Gram 양성 간균이 5.5% 및 진균은 5.4%이었다.
5. 우유에 있는 세균수와 세균 ATP 농도는 정비례관계를 나타냈으며 $r=0.88$ 이었다.

참 고 문 헌

- 김두, 한홍율, 발생요인에 따른 우유의 준입상형 유방염의 감염율에 관한 연구. 서울대학교 수의대 논문집 1982;7:51~63.
- 김태중, 박용호. 유방염 특정 원인체 분리 및 치료약제 선발에 관한 연구. 건국대학교 축산과학연구소 논문집 1987;12:115~128.
- 박용호, 주이석, 강승원, 박정문. 유방염 원인균 분리와 유두침지용 소독약제의 효과에 관한 연구. 농사 시험 연구 논문집 1985;27:39~44.
- Pearson JKL, Greer DO, Spence BK. The relationship between bulk milk cell counts and cow quarter mastitis incidence. *Vet Rec* 1971; 88:488~493.
- Zeidler H, Tolle A, Heeshen W. Verbesserte Preparationstechnik zur elektronischen Bestimmung des Zellgehaltes in Milch. *Milchwissenschaft* 1968;23:564.
- Schmidt-Madson P. Fluoro-opto-electronic cell-counting on milk. *J Dairy Res* 1975; 42:227~239.
- Bossuyt R. Determination of bacteriological quality of raw milk by an ATP assay technique. *Milchwissenschaft* 1981;36(5):257~260.
- 최병규, 김종배, 신현길, 이승배. Bioluminescence 방법에 의한 계육 표면에 존재하는 세균수 측정. *한국식품 과학회지* 1986; 18(2):88~92.
- 한석현, 김창한, 김종배, 신현길, 이승배. 생물학적 발광법에 의한 우유의 세균 측정법에 관한 연구. *한국 축산학회지* 1986;18(2):88~92.
- Schneider RO, Jasper DE. Standardization of the California mastitis test. *Am J Vet Res* 1964; 25:1635~1640.
- Richard L, McDonald JS, Fictner RE, et al. Identification of Yeast from bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. *Am J Vet Res* 1980;41:1991~1994.
- Moore GS, Jaciow DW. Mycology for the clinical laboratory. Reston Virginia; *Reston Pub Co inc*, 1972:169~192.
- 유병우, 경기도 일원의 유방염 감염율과 원유의 세균 및 체세포 측정에 따른 유질 오염도에 관한 연구. 서울대학교 보건대학원 석사논문 1984.
- 서호봉, 이광원, 오성용. 성환지방의 우유 유방염에 관한 연구. 1. 유방염 발생 실태와 그 원인균 조사. *대한수의학회지* 1981;21:161~165.
- McElory WD, Hastings JW, Coulombre J, et al. The mechanism of action of pyrophosphate in firefly luminescence. *Arch Biochem Biophys*. 1953;46:399~416.
- Deluca M, McElory WD. Kinetics of the firefly luciferase catalysed reactions. *Biochemistry* 1974; 13:921~925.
- Wulff K, Haar HP, Michal G. Constant light signals in ATP assays with firefly luciferase: A kinetic explanation. In: Serio M and pazzagli ed. *Luminescent assay* perspectives in endocrinology and clinical chemistry. New York Raven-press 1982;47~52.
- Chappell EW, Levin CV. Use of the firefly bioluminescence reaction for rapid deflection and counting of bacteria. *Biochem Med* 1968;2:42~52.
- Ludin A, Thore A. Analytical information obtainable by evolution of the time course of firefly bioluminescence in the assay of ATP. *Anal Biochem* 1975;66:47~63.
- Obara Y, Komatsu M. Relationship between N-acetyl-D-Glucosaminidase activity and cell count, lactose, chloride or lactoferrin in cow milk. *J Dairy Sci* 1984; 67:1043~1046.
- Poultrel B, Lerondelle C. Cell content of Goat milk: California mastitis test, coulter counter and fossomatic for predicting half infection. *J Dairy Sci* 1983; 66:2575~2579.
- Arnott J. *Bulk milk somatic cell counts: Their interpretation and use*. Dairy Farming Annual Massey Uni 1981.
- 여상건, 최원필. 젖소유방염에 관한 효모양 진균에 관한 연구. 1. 역학적 조사. *대한수의학회지* 1982;22:121~138.
- 장국현, 김태중. 유방염 감염 우유에서 분리된 효모양 진균에 관한 연구. *대한수의학회지* 1984; 20(11):684~691.
- William MLB. The limitation of the Dupont luminescent biometer in microbiological analysis of food. *Can Inst Food Technol J* 1971;4:187.
- Bossuyt R. Usefulness of an ATP assay technique in evaluating the somatic cell content of

milk. *Milchwissenschaft* 1978;33(1):11~13.

27. Waes G, Bossuyt, Moffar J. A rapid method for the detection of non-sterile UHT milk by

the determination of the bacterial ATP. *Milchwissenschaft* 1984; 39(12):707~711.