

<원 저>

젖소 유방염에서 16S rRNA 파이로시퀀싱을 이용한 우유 내 마이크로바이옴의 동정과 난백의 항균효과

김단일^{1,3,4} · 김은경^{1,3} · 성원진^{1,2} · 노영혜^{1,3} · 고대성^{1,2} · 김남형² · 김재홍^{2,4} · 권혁준^{1,3,4,*}

¹서울대학교 수의과대학 산업동물의학연구소, ²조류질병연구소

³서울대학교 그린바이오과학기술연구원 산업동물임상교육연수원, ⁴수의과학연구소

(접수: 2017년 2월 16일, 수정: 2017년 4월 19일, 게재승인: 2017년 5월 11일)

Identification of microbiome with 16S rRNA gene pyrosequencing and antimicrobial effect of egg white in bovine mastitis

Danil Kim^{1,3,4}, Eun-Kyung Kim^{1,3}, Won-Jin Seong^{1,2}, Younghye Ro^{1,3}, Dae-Sung Ko^{1,2}, Nam-Hyung Kim², Jae-Hong Kim^{2,4}, Hyuk-Joon Kwon^{1,3,4,*}

¹Department of Farm Animal Medicine, ²Laboratory of Avian Diseases, College of Veterinary Medicine, and

⁴Research Institute for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

³Farm Animal Clinical Training and Research Center, Institutes of GreenBio Science Technology, Pyeongchang 25354, Korea

(Received: February 16, 2017; Revised: April 19, 2017; Accepted: May 11, 2017)

Abstract: Bovine mastitis is an important microbial disease in the dairy industry. We investigated the frequencies of bacterial pathogens in 62 farms and pathogen antibiotic resistance from mastitis samples (n = 748). We tested the antimicrobial activity of chicken and duck egg white and lysozyme purified from chicken egg white. Moreover, we compared the microbiomes of normal and mastitic raw milk obtained by 16S rRNA gene pyrosequencing and culture methods. The results showed that the frequencies of Gram-positive pathogens (*Enterococcus faecalis* 37% and *Staphylococcus aureus* 36%) were higher than that of a Gram-negative pathogen (*Escherichia coli* 15%). Resistance frequencies to ampicillin and norfloxacin were lowest in *Staphylococcus aureus* (21%), *Enterococcus faecalis* (23%), and *Escherichia coli* (33%), and the antimicrobial activity of chicken egg white was higher than those of lysozyme and duck egg white. Pyrosequencing results revealed clear differences between the microbiomes of mastitic and normal raw milk samples and revealed a slightly similar, but clearly different, composition of pathogens compared to that from the culture method. Thus, pyrosequencing may be useful for elucidating changes in microbiomes during mastitis progression and treatment. A chicken egg white and antibiotic combination may help with mastitis treatment; however, further studies are needed.

Keywords: antibiotic resistance, bovine mastitis, microbial pathogens, microbiome, raw milk

서 론

젖소의 유방염은 임상형과 준임상형으로 분류되며, 국내외 낙농산업에서 가장 중요한 질병 중의 하나로서 우유 생산 감소, 생산된 우유의 폐기, 조기 도태, 치료비 부담 등으로 농가에 막대한 경제적 손실을 초래한다. 임상형 유방염에 의한 경제적 피해는 전 세계적으로 두당 연간 평균 61~97유로이며

국내에서도 상당한 경제적 피해를 초래하고 있으나, 준임상형을 포함하는 경우 그 피해가 더 증가할 것으로 예상된다 [12].

유방염의 원인균으로 137종의 세균이 알려져 있으며, 주요 원인균은 *Staphylococcus* 종이고 coagulase negative staphylococci(CNS), Gram negative bacilli(GNB), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* 종, *Enterococcus* 종 순으로 주종을 이루고 있다. 주로 축사 환경 유래 세균으로 알려져 있고

*Corresponding author

Tel: +82-33-339-6111, Fax: +82-33-339-6119

E-mail: kwonhj01@snu.ac.kr

[31], 2가지 이상 세균의 복합감염이 흔하다 [21, 22]. CNS의 경우 국가와 지역에 따라 차이를 보이는데, 국내는 *Staphylococcus(S.) auricularis*, 미국 테네시주는 *S. chromogenes*, 루이지애나주의 경우에는 *S. hyicus*가 빈발하는 것으로 보고되고 있다 [21, 32]. GNB의 경우 *Escherichia coli*를 제외하고 *Acinetobacter* 종, *Pseudomonas* 종, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas* 종 순으로 빈발하는 것으로 알려져 있다 [21]. 환경 유래 *Streptococcus* 종의 경우에는 *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus equinus*가, *Enterococcus* 종의 경우에는 *Enterococcus(E.) faecalis*와 *E. faecium*이 주로 보고되고 있다 [21].

최근 16S rRNA 유전자 파이로시퀀싱(pyrosequencing) 기술을 이용하여 다양한 미생물이 혼합된 시료에서 미생물의 조성을 알아볼 수 있게 되었으며, 이를 통해 배양이 까다로운 미생물의 조성 및 각 미생물의 빈도를 알아볼 수 있게 되었다 [4, 8, 20, 23, 25, 26]. 따라서 파이로시퀀싱을 이용한 동정법은 유방염 진단에 있어서 전통적인 배양법에 의한 동정법의 한계를 극복할 수 있고, 더 나아가 젖소 유방염의 병태생리를 이해하는 데에 유용한 도구로 이용될 수 있다.

한편, 유방염 원인균은 높은 빈도의 항균제 내성을 보이며 다약제 내성을 보유한 경우도 보고되고 있어 치료를 위한 효과적인 항균제 선발에 어려움이 있으며, *S. aureus*와 *E. faecalis*는 천연 항균제인 라이소자임에 대한 내성을 획득하는 것으로 알려져 있다 [3, 19, 22, 29]. 닭 난황 면역글로불린(IgY)은 *S. aureus*에 의한 유방염 치료에 효과가 있어 항생제 대체재로서의 가능성을 보인 바 있으나 난백을 이용한 연구는 많지 않은 상황이다 [33].

따라서 본 연구에서는 각 목장에서 유방염으로 진단받은 젖소의 우유를 전통적인 배양법과 파이로시퀀싱을 이용한 동정법을 비교하여 파이로시퀀싱을 이용한 동정법의 유효성을 조사하였다. 또한 주요 유방염 원인균으로 분리된 세균의 항생제 감수성을 확인한 후 천연 항균제인 난백과 라이소자임의 감수성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료

2014년 12월부터 2016년 12월까지 전국 62개 젖소목장에서 유방염으로 진단된 748개 원유 시료를 받아 냉장 또는 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 유방염의 진단은 캘리포니아 밀크테스트를 이용하여 각 목장의 착유자의 판단으로 이루어졌으며 관능검사를 통해 분변 오염이 확인되지 않는 시료만을 사용하였다. 파이로시퀀싱을 위한 유방염 혼합원유는 목장에서 2015년 1월부터 8월까지 수집하여 냉장 보관한 원유를 이용하였고, 정상원유는 서울대학교 평창캠퍼스의 실험목장에서 1 mL 당 체세포수 50,000개 미만인 원유를 혼합하여 바로 실험에 사용하였다. 파이로시퀀싱을 위한 농장별 유방염 원유 시료는 시료별로 동량을 혼합하여 냉동보관 후 실험에 사용하였다.

세균의 분리 및 동정

시료를 멸균 생리식염수로 10^{-3} ~ 10^{-5} 희석하여 5% 면양혈 액한천배지(Hangang, Korea)에 도말한 후 37°C 항온기에서 18시간 배양하였다. 집락의 크기, 모양 및 용혈 유형에 따라 분류한 후 각각의 집락을 채취하여 Tryptic soy broth에서 18시간 배양한 후 그람양성균인 경우 GP ID card, 그람음성균인 경우 GN ID card에 배양균을 접종하여 VITEK 2 compact(bioMérieux, France) 기기에 장착한 후 균종을 동정하였으며 동정 신뢰도 95% 이상인 결과만을 사용하였다.

항생제 감수성 검사

배양법에 의해 동정된 세균 중 *S. aureus* 62주, *S. chromogenes* 25주, *E. faecalis* 44주, *Streptococcus uberis* 21주, *Kocuria(K.) rosea* 14주, *Lactococcus(L.) garvieae* 30주, *Aerococcus(A.) viridans* 11주, *Escherichia coli* 9주, *Serratia marcescens* 19주, *Raoutella(R.) planticola* 7주, *A. hydrophila/A. cavieae* 11주, *Klebsiella oxytoca* 6주, *Hafnia(H.) alvei* 3주 등 총 262주에 대해 겐타마이신, 설파메톡사졸/트라이메토프림, 스트렙토마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 노플록사신, 네오마이신, 클록사실린 항균제 디스크(BD, USA)를 사용하여 Clinical and Laboratory Standards Institute (USA)에서 제시한 디스크 확산법에 따라 항균제 감수성 검사를 하였다 [6].

난백 및 라이소자임 감수성 검사

유방염 주요 원인균의 닭 및 오리의 난백과 라이소자임에 대한 감수성을 평가하기 위하여, 닭과 오리의 알을 70% 에탄올 솜으로 깨끗하게 세척한 후 무균적으로 난백을 분리한 후 동량의 멸균 생리식염수를 첨가하였다. 계란 난백으로부터 정제한 라이소자임(Sigma-Aldrich, USA)을 멸균 생리식염수에 3 mg/mL 농도로 용해했다. Müller Hinton Broth (BD)로 2진 희석한 닭 및 오리 난백과 라이소자임 100 μ L를 각 well에 분주한 후, 18시간 배양한 *S. aureus*(PMB2), *S. hemolyticus*(PMB6), *S. chromogenes*(PMB12), *Streptococcus uberis*(PMB21), *L. garvieae*(PMB39), *E. faecalis*(ADL1), *K. rosea*(PMB165)를 Müller Hinton Broth로 5×10^4 colony-forming unit/100 μ L가 되도록 희석하여 96-well 배양용기에 첨가(시료당 2개 well)한 후 교반하였고, 37°C 항온기에서 18시간 배양한 후 세균이 자라지 않은 최고 희석배수의 평균을 항균역가로 하였다.

유전자 추출, 중합효소연쇄반응 및 파이로시퀀싱

유전자 추출 및 중합효소연쇄반응은 ChunLab(Korea)에서 수행하였다. 원유 내의 전체 미생물 유전체는 원유에 라이소자임(30 mg/mL; Sigma-Aldrich) 및 mutanolysin 20 U를 첨가하고 37°C에서 60분간 반응시킨 후 QIAamp DNA Stool Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 추출하였다 [5]. 중합효소연쇄반응은 16S rRNA 유전자의 V1에서 V3 부분을 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하였으며, 바코드 프라이머로

Table 1. Frequencies of bacterial pathogens in mastitis-affected farms (n = 62)

Gram staining	Bacteria	Frequency	Rate (%)	
Positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	22	35.5%	
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	16	25.8%	
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9	14.5%	
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	5	8.1%	
	<i>Staphylococcus simulans</i>	4	6.5%	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	6.5%	
	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	2	3.2%	
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	1.6%	
	<i>Staphylococcus saprolyticus</i>	1	1.6%	
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	1.6%	
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	1.6%	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	23	37.1%	
	<i>Enterococcus faecium</i>	3	4.8%	
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	3.2%	
	<i>Enterococcus cloacae</i>	2	3.2%	
	<i>Enterococcus avium</i>	1	1.6%	
	<i>Enterococcus raffinosus</i>	1	1.6%	
	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	1	1.6%	
	<i>Streptococcus uberis</i>	9	14.5%	
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i>	9	14.5%	
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i>	4	6.5%	
	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	1	1.6%	
	<i>Streptococcus ovis</i>	1	1.6%	
	<i>Streptococcus thoralensis</i>	1	1.6%	
	<i>Streptococcus infantarius</i> ssp. <i>coli</i>	1	1.6%	
	<i>Kocuria rosea</i>	13	21.0%	
	<i>Kocuria kristinae</i>	3	4.8%	
	<i>Kocuria varians</i>	2	3.2%	
	<i>Lactococcus garvieae</i>	5	8.1%	
	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	2	3.2%	
	<i>Aerococcus viridans</i>	6	9.7%	
	<i>Dermatococcus nishinomiyaensis</i>	5	8.1%	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3	4.8%	
	Negative	<i>Escherichia coli</i>	9	14.5%
		<i>Serratia marcescens</i>	6	9.7%
		<i>Serratia liquefaciens</i>	2	3.2%
		<i>Serratia fonticola</i>	1	1.6%
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	8.1%
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	2	3.2%
		<i>Raoutella planticola</i>	6	9.7%
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		4	6.5%	
<i>Aeromonas sobria</i>		2	3.2%	
<i>Hafnia alvei</i>		5	8.1%	
<i>Acinetobacter baumannii</i>		1	1.6%	
<i>Acinetobacter junii</i>		1	1.6%	
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		1	1.6%	
<i>Citrobacter braakii</i>		2	3.2%	
<i>Citrobacter freundii</i>		1	1.6%	
<i>Enteribacter amnigenus</i>		3	4.8%	
<i>Proteus vulgaris</i>		3	4.8%	

27F(5'-CCTATCCCCTGTGTGCCCTTGGCAGTC-TCAG-AC-GAGTTTGATCMTGGCT CAG-3')와 518R(5'-CCATCTCA TCCCTGCGT GTCTCCGAC-TCAG-X-AC-WTTA CCGC GGCTGCTGG-3'(밑줄 그은 염기서열은 표적 유전자 서열이며 X는 바코드를 나타냄)를 사용하여 95°C로 5분 변성 후 95°C, 55°C, 72°C에서 각각 30초의 반응을 30회 반복한 후 72°C로 5분간 중합효소연쇄반응을 수행하여 미생물 유전체를 증폭하였다. 증폭산물은 QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen)로 정제하였으며, 동일 농도의 증폭산물을 혼합한 후 비특이적인 증폭산물을 Agencourt AMPure Beads Kit(Beckman Coulter, USA)로 제거하였다. 정제된 증폭산물의 품질과 크기를 DNA 7500 chip과 Bioanalyzer 2100(Agilent, USA)으로 확인한 후, GS Junior Sequencing System (Roche, USA)으로 염기서열을 결정하였다.

데이터 분석

데이터 분석은 기존의 방법에 따라 수행하였다 [5, 14, 16]. 시료로부터 얻은 리드(reads)는 고유의 바코드에 의해 분류하였고, 바코드, 링커 및 프라이머 염기서열은 제거하였으며, 비특이적인 염기서열을 2개 이상 가지고 있거나 low quality score(average score < 25) 또는 300 염기쌍보다 작은 경우는 분석에서 배제하였다. 키메라 서열은 forward half 와 reverse half 염기서열을 BLASTn 검색으로 비교하는 bellerophone method로 배제하였다 [13]. 각 염기서열의 taxonomic classification을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열의 데이터베이스인 EzBioCloud database(ChunLab)를 사용하였다. 시료의 richness and diversity는 Chao1 estimation과 Shannon diversity index(3% distance)로 결정하였고 [11], 시료 간 서로 다른 리드 크기를 비교하기 위해 리드 크기를 동등화하는 무작위 부분추출(random subsampling)을 수행하였다. 커뮤니티 간의 전체 계통 거리는 Fast UniFrac으로 예측하였으며 Principal Coordinate Analysis로 시각화하였다 [11]. 시료 간의 operational taxonomic unit(OTU)를 비교하기 위해 CLcommunity 프로그램의 XOR 분석기술로 공통 OTUs(shared OTUs)를 얻었다(ChunLab). 이렇게 확보한 데이터를 기초로 유방염 혼합원유와 정상원유 내 마이크로바이옴의 빈도를 비교하였다.

결 과

배양법에 의한 유방염 원인균의 동정

배양법에 의한 원인균 동정 결과를 바탕으로 62개 목장의 748개 시료 각각에서 분리 동정된 균종을 목장별 출현 빈도로 Table 1에 제시하였다. 모든 시료에서 2종 이상의 세균의 복합감염이 확인되었고, 그람음성균에 비해 그람양성균의 빈도가 높았으며, *Staphylococcus* 종, *Enterococcus* 종, *Streptococcus* 종, *Kocuria* 종 순으로 높은 빈도를 보였다. 원인균으로는 *E. faecalis* 37.1%, *S. aureus* 35.5%, *S. chromogenes* 25.8%, *K. rosea* 21.0%, *S. hemolyticus* 14.5%,

Streptococcus uberis 14.5%, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* 14.5%, *A. viridans* 9.7%, *L. garvieae* 8.1%, *Dermatococcus nishinomiyaensis* 8.1%의 비율로 농장에서 분리되었다. 그람음성균으로는 *Escherichia coli* 14.5%, *S. marcescens* 9.7%, *R. planticola* 9.7%, *Klebsiella oxytoca* 8.1%, *H. alvei* 8.1%, *A. hydrophila/A. caviae* 6.5%의 비율로 농장에서 분리되었다.

유방염 혼합원유와 정상원유 내 마이크로바이옴 비교

유방염 혼합원유 내 마이크로바이옴을 조사하기 위해 16S rRNA 유전자 파이로시퀀싱을 수행하였고, 실험 결과의 재현성을 확인하기 위해 동일 시료에 대해 16S rRNA 유전자 파이로시퀀싱을 반복 실시하였다. 그 결과 세균 종의 빈도와 우점 순서가 유사하여 재현성이 확인되었다(Table 2). 유방염 혼합원유에는 *Lactococcus* 종 29.7/27.2%(*L. raffinolactis* 20.5/19.1%, *L. chungangensis* 7.0/6.4%, *L. lactis* group 2.2/1.7%), *Enterococcus* 종 19.0/19.3%(*E. pseudoavium* group 15.8/15.9%, *E. malodoratus* group 3.2/3.4%), *Clostridium* 종 17.2/15.9%(*Clostridium* [C.] *estertheticum* group 15.1/13.6%, *C. bowmanii* 2.1/2.3%), *Yersinia* 종 5.2/5.0%(*Yersinia kristensenii* 2.9/2.4%, *Yersinia massiliensis* 2.3/2.6%), *Pseudomonas* 종 4.8/4.7%(*Pseudomonas* [P.] *gessardii* group 2.2/2.9%, *P. cedrina* group 2.6/1.8%)의 세균들이 우점하고 있었으며 유방염과 관련된 것으로 알려진 *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. marcescens* 등의 세균들은 1% 미만의 빈도를 보였다. 정상원유의 경우 *Sterolibacterium* 종 4.0%, *Sulfuritalea* 종 6.7%(*Sulfuritalea hydrogenivorans* 3.5%, *Sulfuritalea* sp. 3.2%)와 배양되지 않는 세균들이 3% 이하(AM713401 3.0%, JN679120 3.0%, AB186832 2.0%, AB269814 2.0% 등)의 빈도를 보여 특정 세균의 빈도는 높지 않았고, 유방염 원인균으로는 유일하게 *S. chromogenes* (0.4%)가 검출되었다(Table 2). 유방염 혼합원유와 정상원유에 분포하는 세균들 중에서 *Pseudomonas* 종의 다양성에 차이가 관찰되었는데 유방염 혼합원유에서 정상원유에 비해 다양한 *Pseudomonas* 종이 확인되었다.

16S rRNA 유전자 파이로시퀀싱법과 세균분리 동정법 비교

농장에서 의뢰된 유방염 원유를 혼합한 후 농장별로 16S rRNA 유전자 파이로시퀀싱을 수행하여 세균배양 동정법 결과와 비교하였다(Table 3). 그 결과 PMM6 농장의 경우 세균배양법으로는 *S. aureus*, *Serratia liquefaciens* group, *R. planticola*가 동정되었으나 파이로시퀀싱법으로는 *Enterobacter aerogenes*(7.5%)와 *Serratia plymuthica*(7.0%)가 높은 빈도를 보였고, *S. aureus*는 검출되지 않았으나 *Serratia liquefaciens* group(3.2%)과 *R. planticola*(0.7%)는 검출되었다. PMM7 농장의 경우 파이로시퀀싱법으로는 *P. cedrina* group(87.5%)이 매우 높은 우점도를 보였으나 유방염 원인균으로는 *Streptococcus dysgalactiae*(0.03%)만 검출되어 세균

Table 2. Comparison of microbiota of mastitis and normal raw milk samples by 16S rRNA pyrosequencing

Rank of major species	Mastitis raw milk	Normal raw milk
1	<i>Lactococcus raffinolactis</i> (20.5%/19.1%)	<i>Sterolibacterium</i> sp. (4.2%)
2	<i>Enterococcus pseudoavium</i> group (15.8%/15.9%)	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (3.5%)
3	<i>Clostridium estertheticum</i> group (15.1%/13.6%)	AM713401 (UC, 3.3%)
4	<i>Lactococcus chungangensis</i> (7.0%/6.4%)	<i>Sulfuritalea</i> sp. (3.2%)
5	<i>Enterococcus malodoratus</i> group (3.2%/3.4%)	JN679120 (UC, 2.8%)
6	<i>Rahnella aquatilis</i> (3.0%/4.0%)	AB186832 (UC, 2.2%)
7	<i>Yersinia kristensenii</i> (2.9%/2.4%)	AB269814 (UC, 2.0%)
8	<i>Pseudomonas gessardii</i> group (2.2%/2.9%)	<i>Ferribacterium limneticum</i> (1.8%)
9	<i>Yersinia massiliensis</i> (2.3%/2.6%)	FQ660083 (UC, 1.5%)
10	<i>Pseudomonas cedrina</i> group (2.6%/1.8%)	<i>Sideroxydans</i> sp. (1.5%)
11	<i>Clostridium bowmanii</i> (2.1%/2.3%)	<i>Gallionella</i> sp. (1.4%)
12	<i>Lactococcus lactis</i> group (2.2%/1.7%)	<i>Gallionellaceae</i> sp. (1.4%)
13	<i>Lactobacillus casei</i> group (1.5%/1.9%)	<i>Rhodocyclaceae</i> sp. (1.2%)
14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> group (1.5%/1.2%)	EF565154 (UC, 1.0%)
Mastitis related bacteria	<i>Enterococcus faecalis</i> (0.2%) <i>Enterococcus faecium</i> (0.3%) <i>Serratia liquefaciens</i> (0.6%) <i>Serratia plymuthica</i> (0.5%) <i>Enterobacter aerogenes</i> (0.3%)	<i>Staphylococcus chromogenes</i> (0.4%)
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas meridiana</i> group (0.6%/0.3%) <i>Pseudomonas deceptionensis</i> (0.5%/0.4%) <i>Pseudomonas asturiensis</i> (0.2%/0.3%) <i>Pseudomonas caeni</i> (0.2%/0.3%) <i>Pseudomonas fragi</i> group (0.1%/0.3%) <i>Pseudomonas panacis</i> (0.2%/0.2%) <i>Pseudomonas brenneri</i> group (0.1%/0.2%) <i>Pseudomonas koreensis</i> (0.2%/0.0%)	<i>Pseudomonas syringae</i> group (0.5%) <i>Pseudomonas constantinil</i> group (0.4%) <i>Pseudomonas cedrina</i> group (0.2%)

UC, uncultured bacteria.

배양법에서 확인된 *E. faecalis*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *H. alvei*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *L. garvieae* 와는 차이를 보였다. PMM8-PMM12의 각 농장은 *P. meridiana*(36.9%), *P. meridiana* group(36.6%), *P. caeni* (10.3%), *P. fragi* group(26.2%), *P. meridiana* group(46.7%)가 상대적으로 높은 우점도를 보였고, 세균배양법과 일부 유사하지만 다른 유방염 동정 결과를 보였다.

항생제 감수성 현황

주요 유방염 원인균 262주의 항생제 내성률을 조사하여 Table 4에 제시하였다. *S. aureus* 분리주의 경우, 겐타마이신 (37.1%), 설파메톡사졸/트라이메토프림(37.1%), 암피실린 (21.0%), 테트라사이클린(35.5%) 클록사실린(35.5%)에 대해 비교적 낮은 내성률을 보였으나, 스트렙토마이신(87.1%) 및 네오마이신(75.8%)에 대해서는 높은 내성률을 보였으며, 모든 항생제에 내성을 보인 경우(3%)도 있었다. *E. faecalis* (22.7%)와 *L. garvieae*(23.3%)는 암피실린을 제외한 모든 항생제에 대해 상대적으로 높은 내성률을 보였고, 분리주의 11.4%와 10.0%는 검사한 항생제 모두에 대해 내성을 보였다. *S. chromogenes*(0.0%), *K. rosea*(7.1%), *A. viridans*(0.0%)는 모두 겐타마이신에 대한 내성률이 가장 낮았고, *Streptococcus uberis*는 암피실린(4.8%)에 대한 내성률이 가장 낮았

다. 그람음성균의 경우 스트렙토마이신, 암피실린, 테트라사이클린, 클록사실린에 대한 내성률이 비교적 높았으며 *Klebsiella oxytoca*와 *R. planticola* 분리주 66.7%와 14.3%는 모든 항생제에 내성을 보였다. 각 항생제의 평균 내성률을 비교해 보면 노플록사신(31.9%), 겐타마이신(34.5%), 설파메톡사졸/트라이메토프림(42.1%)의 내성률이 비교적 낮았다.

유방염 원인균에 대한 라이소자임 및 난백 감수성

*S. aureus*에 대해서는 닭의 난백, 라이소자임, 오리 난백은 각각 평균 384배, 256배, 192배 희석 배수까지 항균효능을 보였다. *S. hemolyticus*에 대해서는 닭의 난백, 라이소자임, 오리 난백은 각각 8,192배, 2,048배, 8,192배 희석 배수까지 항균효능을 보였다. *S. chromogenes*에 대해서는 닭의 난백, 라이소자임, 오리 난백은 각각 3,072배, 1,024배, 2,048배 희석 배수까지 항균효능을 보였다. *Streptococcus uberis*에 대해서는 닭의 난백, 라이소자임, 오리 난백은 각각 192배, 0배, 126배 희석 배수까지 항균효능을 보였다. *L. garvieae*에 대해서는 닭의 난백, 라이소자임, 오리 난백은 각각 768배, 512배, 768배 희석 배수까지 항균효능을 보였다. *E. faecalis*에 대해서는 닭의 난백, 라이소자임, 오리 난백은 각각 48배, 32배, 32배 희석 배수까지 항균효능을 보였다. *K. rosea*에 대해서는 닭의 난백, 라이소자임, 오리 난백은 각각 4,096배,

Table 3. Comparison of microorganism in mastitis milk by 16S rRNA pyrosequencing- and culture-based identification

Farm	16S rDNA pyrosequencing-based identification		Culture-based identification
	Major species (% frequency)	Mastitis-related species (% frequency)	
PMM6	<i>Sterolibacterium</i> sp. (5.54%), <i>Sulfuritalea</i> sp. (4.88%), <i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (4.27%), <i>JN679120</i> (UC, 2.91%), <i>Gallionella</i> sp. (2.54%), <i>AB186832</i> (UC, 2.44%), <i>Ferribacterium limneticum</i> (2.21%), <i>Gallionellaceae</i> sp. (1.97%), <i>Sideroxydans</i> sp. (1.69%), <i>Rhodocyclaceae</i> sp. (1.13%)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (7.52%), <i>Serratia plymuthica</i> (7.0%), <i>Serratia liquefaciens</i> group (3.15%), <i>Serratia</i> spp. (1.83%), <i>Rouletella planticola</i> (0.7%)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> group, <i>Raoultella planticola</i>
PMM7	<i>Pseudomonas cedrina</i> group (87.52%), <i>Pseudomonas grimontii</i> group (4.05%), <i>Pseudomonas panacis</i> (3.86%), <i>Pseudomonas syringae</i> group (1.65%), <i>Pseudomonas baetica</i> (1.18%)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (0.03%)	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> , <i>Lactococcus garvieae</i>
PMM8	<i>Pseudomonas meridiana</i> (36.89%), <i>Pseudomonas fragi</i> group (14.19%), <i>Pseudomonas deceptionensis</i> (4.48%), <i>Pseudomonas panacis</i> (3.12%), <i>Pseudomonas baetica</i> (1.11%)	<i>Staphylococcus aureus</i> (0.57%), <i>Serratia liquefaciens</i> group (0.27%), <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> (0.02%)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Aerococcus viridans</i>
PMM9	<i>Pseudomonas meridiana</i> group (36.56%), <i>Pseudomonas gessardii</i> group (8.98%), <i>Pseudomonas panacis</i> (6.39%), <i>Pseudomonas fragi</i> group (4.82%), <i>Pseudomonas costantini</i> group (3.65%), <i>Pseudomonas cedrina</i> group (3.56%), <i>Pseudomonas pseudomonas breneri</i> group (3.42%), <i>Pseudomonas baetica</i> (2.4%), <i>Pseudomonas caeni</i> (2.37%), <i>Acinetobacter haemolyticus</i> (2.11%), <i>Pseudomonas</i> sp. (UC, 1.54%), <i>AM491461</i> (UC, 2.14%), <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (3.25%), <i>Oceanisphaera profunda</i> (3.45%)	<i>Serratia liquefaciens</i> (6.56%), <i>Enterococcus faecalis</i> (0.4%), <i>Staphylococcus chromogenes</i> (0.06%), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (0.03%), <i>Lactococcus raffinolactis</i> (0.06%)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i>
PMM10	<i>Pseudomonas caeni</i> (10.33%), <i>Psychrobacter fulvigenes</i> (2.14%), <i>4P00662</i> (UC, 1.9%), <i>Pseudomonas</i> sp. (UC, 1.41%), <i>FJ681620</i> (UC, 1.8%), <i>EU472508</i> (UC, 1.22%), <i>HQ716126</i> (UC, 1.61%), <i>Marinospirillum minutulum</i> (1.51%), <i>Marinospirillum megaterium</i> (1.46%), <i>Marinospirillum</i> sp. (UC, 1.17%), <i>Acholeplasmataceae</i> sp. (UC, 3.27%), <i>Marinobacter</i> sp. (UC, 1.02%)	<i>Streptococcus uberis</i> (3.85%)	<i>Staphylococcus vitulinus</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Streptococcus uberis</i>
PMM11	<i>Pseudomonas fragi</i> group (26.15%), <i>Pseudomonas meridiana</i> group (22.94%), <i>Pseudomonas baetica</i> (12.63%), <i>Pseudomonas gessardii</i> group (7.39%), <i>Pseudomonas deceptionensis</i> (6.5%), <i>Pseudomonas cedrina</i> group (2.68%), <i>Pseudomonas panacis</i> (1.95%), <i>Pseudomonas asturiensis</i> (1.87%), <i>Acinetobacter haemolyticus</i> (1.73%), <i>Pseudomonas amygdali</i> (1.37%)	<i>Staphylococcus aureus</i> group (1.56%)	<i>Staphylococcus vitulinus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus warneri</i>
PMM12	<i>Pseudomonas meridiana</i> group (46.7%), <i>Pseudomonas caeni</i> (12.52%), <i>Pseudomonas fragi</i> group (10.64%), <i>Pseudomonas</i> sp. (UC, 1.98%), <i>Pseudomonas cedrina</i> group (1.15%), <i>Pseudomonas ceceptonensis</i> (1.02%), <i>EU472508</i>	<i>Aerococcaceae</i> (UC, 0.22%)	<i>Aerococcus viridans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus hyicus</i>

Table 4. Antibiotics resistance of major bovine mastitis bacteria

Bacteria	Number of isolate	% of resistance to antibiotics								
		GM	SXT	S	AM	TE	NOR	N	CX	RA
<i>Staphylococcus aureus</i>	62	37.1	37.1	87.1	21.0	35.5	43.5	75.8	35.5	3.2
<i>Staphylococcus chromogens</i>	25	0.0	28.0	16.0	16.0	16.0	4.0	8.0	52.0	0.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	44	86.4	59.1	95.5	22.7	81.8	79.5	86.4	88.6	11.4
<i>Streptococcus uberis</i>	21	61.9	38.1	57.1	4.8	57.1	38.1	38.1	52.4	0.0
<i>Kocuria rosea</i>	14	7.1	71.4	92.9	35.7	14.3	21.4	21.4	50.0	7.1
<i>Lactococcus garvieae</i>	30	43.3	83.3	80.0	23.3	76.7	76.7	73.3	93.3	10.0
<i>Aerococcus viridans</i>	11	0.0	9.1	18.2	0.0	9.1	18.2	0.0	36.4	0.0
<i>Escherichia coli</i>	9	44.4	55.6	100	100	88.9	33.3	88.9	100	0.0
<i>Serratia marcescens</i>	19	5.3	15.8	89.5	94.7	94.7	5.3	15.8	100	0.0
<i>Raoultella planticola</i>	7	42.9	57.1	85.7	100	100	28.6	85.7	100	14.3
<i>Aeromonas hydrophila/Aeromonas caviae</i>	11	36.4	9.1	72.7	100	63.6	0.0	18.2	100	0.0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	83.3	83.3	83.3	100	83.3	66.7	83.3	100	66.7
<i>Hafnia alvei</i>	3	0.0	0.0	0.0	100	66.7	0.0	33.3	100	0.0
Total (average)	262	(34.5)	(42.1)	(67.5)	(55.2)	(60.6)	(31.9)	(48.3)	(77.6)	(8.7)

GM, gentamicin; SXT, sulphamethoxazole/trimethoprim; S, streptomycin; AM, ampicillin; TE, tetracycline; NOR, norfloxacin; N, neomycin; CX, cloxacillin; RA, resistance to all tested antibiotics.

Table 5. Susceptibility of major bovine mastitis bacteria to chicken egg white, lysozyme and duck egg white

Bacteria	Chicken egg white	Lysozyme (3 mg/mL)	Duck egg white
<i>Staphylococcus aureus</i> (PMB2)	384*	256	192
<i>Staphylococcus hemolyticus</i> (PMB6)	8,192	2,048	8,192
<i>Staphylococcus chromogenes</i> (PMB12)	3,072	1,024	2,048
<i>Streptococcus uberis</i> (PMB21)	192	–	126
<i>Lactococcus garvieae</i> (PMB39)	768	512	768
<i>Enterococcus faecalis</i> (ADL1)	48	32	32
<i>Kocuria rosea</i> (PMB165)	4,096	2,048	2,048

*Mean reciprocal number of minimal dilution-fold inhibiting growth of tested bacteria.

2,048배, 2,048배 희석 배수까지 항균효능을 보였다. 따라서 주요 젖소 유방염 원인균에 대해 닭의 난백이 상대적으로 높은 항균 효능을 보였다.

고 찰

국내 2006~2010년 준임상형 유방염 원인균은 CNS 38.4%, 그람음성 간균 24.4%, *S. aureus* 18.8%, 연쇄상구균 6.8%, 장구균 4.8%, 미동정균 6.6%로 보고되었으며 2가지 이상 세균의 복합감염이 흔한 것으로 알려져 있다 [20]. 또한, 2012년 유방염 원유 원인균 동정 결과 그람음성 간균이 52.1%, staphylococci가 35%를 차지하였으며, 개별 세균으로는 CNS를 제외하고 대장균이 11.2%, *Klebsiella pneumoniae* 8.1%, *S. aureus* 7.1%, *Enterobacter cloacae* 6.0%, *Serratia marcescens* 3.5%인 것으로 보고된 바 있다 [22]. 기존 연구는 농장과 상관없이 유방염 젖소 개체 단위에서 원

인균의 빈도를 조사하였으나, 본 연구에서는 농장 단위에서 원인균의 빈도를 조사하였다. 그 이유는 동일한 농장의 젖소 간에는 원인균의 수평감염 가능성이 높고, 그로 인해 농장별 시료 수 차이에 의한 원인균 빈도의 왜곡이 발생할 수 있기 때문이다. 또한, 유방염은 개체보다는 우군 단위 즉, 농장 단위에서 관리되는 것이 효율적이라 판단하여 농장별 원인균의 빈도를 조사하였다. 따라서, 본 연구의 원인균 빈도와 기존 연구 결과를 직접 비교하기는 어렵지만, *S. aureus*와 CNS인 *S. chromogenes* 및 *S. hemolyticus*의 빈도가 비교적 높다는 점에서는 유사했고, *E. faecalis*의 빈도가 가장 높고 대장균의 빈도가 상대적으로 낮은 점과 *Streptococcus uberis*(14.5%)와 *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* (14.5%)의 빈도가 비교적 높다는 점은 국내 연구결과와 차이를 보였다. 그러나 스웨덴의 경우 본 연구결과와 유사한 *Streptococcus uberis*(14%)와 *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*(15%)의 빈도를 보였고, 상대적으로 낮은 *Escheri-*

chia coli(4.8%) 빈도를 보였다 [24]. 또한, 그람양성균으로 *K. rosea*, *L. garvieae* 그리고 그람음성균으로 *R. planticola*, *Klebsiella oxytoca*, *H. alvei*와 같은 원인균이 검출되어 원인균의 다양성 면에서 차이를 보였다. 한편, VITEK 2 System을 이용한 세균 동정과정에서 CNS가 *Kocuria* 종으로 잘못 동정 되는 경우가 보고된 바 있다 [2]. 따라서, *Kocuria* 종을 CNS로 판단한다면 이전 연구와 마찬가지로 CNS에 의한 유방염이 가장 많은 목장에서 유방염을 일으킨다고 볼 수 있으나 동정 신뢰도 95% 미만인 결과는 포함하지 않아 이러한 가능성은 낮은 것으로 판단된다. 그러나 향후 최적의 분자동정법을 이용한 추가 검증이 필요할 것으로 생각한다. CNS의 경우 국가와 지역에 따라 빈발하는 종에 차이를 보이는데 국내 전국 농장의 CNS 빈도는 *S. auricularis* 39.0%, *S. simulans* 18.3%, *S. haemolyticus* 12.4%, *S. xylosum* 8.2%, *S. sciuri* 7.6%, *S. hominis* 7.1%, *S. warneri* 4.1%, *S. saprophyticus* 1.7%, *S. epidermidis* 0.9%로 보고되었고, 경기 북부 농장에 대한 조사 결과 *S. chromogenes*가 24.1%로 보고되었다 [15, 21]. 미국의 테네시주의 경우 *S. chromogenes*가 38.1%로 우점하고 있으나 루이지애나주의 경우 *S. hyicus*가 37.2%로 우점하는 것으로 보고되었다 [32]. 본 연구에서는 *S. chromogenes*(25.8%)의 빈도가 가장 높아 전국 농장에 대한 연구결과와 차이를 보였지만 경기 북부 및 미국 테네시주의 결과와 유사하여 원인균의 지역적 차이가 있음을 알 수 있었다 [21].

세균배양법으로는 시료 내 모든 미생물의 생태계를 파악할 수 없으므로 다양한 분자생물학적 기술들이 적용되었는데, 최근에는 차세대 염기서열분석기를 이용한 파이로시퀀싱법이 원유, 유제품 및 유방염 원유 내의 마이크로바이옴 연구에 성공적으로 적용되었다 [25]. 원유에는 다양한 세균들이 존재하는 것으로 알려져 있는데 주로 유산균들로 *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* 종의 빈도가 높으며 이외 저온성균인 *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* 종이 저온 보관 중 증가하는 것으로 알려져 있다 [4, 8, 20, 23, 25, 26]. 유방염 원유의 경우 파이로시퀀싱법과 세균배양법의 결과가 유사하였으나 세균배양법으로 검출되지 않는 병원성 세균들을 포함하여 다양한 마이크로바이옴이 검출되는 것으로 보고되었다 [4, 23]. 본 연구의 유방염 혼합원유는 유산균의 빈도가 가장 높았는데, 정상원유에서 *L. lactis*의 빈도(70~91%)가 높은 데 비해 유방염 혼합원유에서 *L. lactis*는 2.0%였고 *L. raffinolactis*의 빈도(19.8%)가 높았다 [20]. 최근 *Lactococcus* 종의 유방염 관련성이 보고되고 있는데, 특히 *L. lactis*와 *L. garvieae*가 중요한 것으로 보고되어 있으나 *L. raffinolactis*의 관련성은 아직 보고된 바가 없다 [27]. *Enterococcus* 중 중에서 *E. pseudoavium*의 높은 빈도(16.0%)는 의외의 결과로 유방염과의 관련성은 알려지지 않았으며 *C. estertheticum*의 높은 빈도(14.5%)는 냉장보관 중 저온증식의 결과인 것으로 추정되나 냉장보관 원유에서 *Pseudomonas* 종 빈도가 70%까지 증가한다는 보고에 비해

빈도가 5.0%인 것은 다양한 마이크로바이옴의 상호작용 결과인 것으로 추정되었다 [7]. 정상원유의 경우 유방염과 관련이 없는 환경세균(*Sterolibacterium* 종, *Sulfuritalea* 종 등)과 난배양성 세균이 주종을 이루었으며 *S. chromogenes*만이 낮은 빈도로 검출되었고, 유산균은 검출되지 않아 유방염 혼합원유와 큰 차이를 보였다 [17, 28]. 이러한 결과는 체세포 및 세균 수 1등급인 정상원유와 유방염 원유에 존재하는 세균 종 분포의 차이를 극명하게 보여주는 결과이며 향후 세균 수만 1등급인 원유와 마이크로바이옴 비교연구를 통해 국내 원유 내 체세포 수 증가 원인균을 동정하기 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각한다. 유방염 원유의 원인균을 세균배양법과 파이로시퀀싱법으로 비교한 결과 일부 일치하였으나 파이로시퀀싱법 적용 시 *Pseudomonas* 종이 대부분의 시료에서 높은 빈도로 검출된 것은 예상하지 못한 결과였다. *Pseudomonas* 종은 국내 유방염에서 11.1%의 빈도를 보이는 것으로 알려져 있으나 본 연구에서는 파이로시퀀싱을 수행한 7개 농장 중 6개 농장에서 우점균으로 검출되었고, 외국의 경우 원인균이 *P. aeruginosa*인 것과 달리 *P. meridiana*의 농장별 빈도가 높아 차이를 보였다 [21, 24]. 국가별로 유방염 원인균에는 차이가 있고, 기존 국내 연구결과에서는 파이로시퀀싱법을 사용하지 않아 이러한 차이의 직접적인 원인을 알 수 없으나 유방염 원인균의 배양성 차이와 난배양성 세균과 사균도 검출하는 파이로시퀀싱법의 특징이 결합된 결과로 추정되며, 이러한 결과로 볼 때 앞으로는 *P. aeruginosa* 이외의 *Pseudomonas* 종에 대한 관심이 필요할 것으로 보인다.

유방염의 개별 원인균 중 가장 빈발한 *E. faecalis*의 경우 2012년 분리주에서 스트렙토마이신 94.7%, 네오마이신 78.9%, 암피실린에 0.0%의 내성을 보이는 것으로 보고되었는데, 본 연구 결과 중 스트렙토마이신 및 네오마이신에 대한 높은 내성은 유사하였으나 암피실린 내성을 보이는 점(22.7%)은 달랐다 [22]. *S. aureus*는 2012년 분리주의 경우 스트렙토마이신(16.7%), 네오마이신(6.7%), 테트라사이클린(16.7%), 겐타마이신(0%)에 비교적 낮은 내성을 보였으나 암피실린(73.0%)에 대해서는 높은 내성을 보였는데, 본 연구결과에서는 스트렙토마이신(87.1%)과 네오마이신(75.8%)에 대한 내성이 높고 암피실린(21.0%) 내성은 상대적으로 낮아 차이를 보였다 [22]. *Escherichia coli*는 2001~2004년 분리주의 경우 테트라사이클린(49%), 스트렙토마이신(60%), 암피실린(38%)에 대한 내성이 높았지만, 2012년 분리주의 경우 네오마이신(13.8%), 테트라사이클린(20.2%), 겐타마이신(11.7%), 암피실린(36.2%)에 대한 내성이 감소한 것으로 보였다. 그러나 본 연구에서는 겐타마이신(44.4%)을 제외한 위의 항생제에 대해 88.9%~100%의 높은 내성을 보였다. 2012년 연구와 본 연구의 결과가 차이를 보이는 이유는 사용되는 항생제 연고의 변화 및 의뢰 농장의 반복적인 항생제 사용의 결과인 것으로 추정되었다 [19, 22]. 검사한 모든 항생제에 내성을 보인 분리주의 비율이 높았던 *E. faecalis*(11.4%)의 경우 유방염에서의 빈도가 높으므로 관심이 필요하지만,

Klebsiella oxytoca(66.7%), *R. planticola*(14.3%), *L. garvieae* (10.0%)에 대해서도 지속적인 항생제 내성 모니터링이 필요한 것으로 판단되었다.

라이소자임은 세균의 세포벽을 구성하는 펩티도글리칸의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine의 연결을 끊음으로써 세포벽을 약화해 살균효과를 나타내는 천연 항균물질로 체액으로 분비되는 것으로 알려져 있다 [9, 30]. 라이소자임은 그람양성균에 더 효과적인 것으로 알려져 있으나, *S. aureus*는 N-acetylmuramic acid의 C-6-OH에 아세틸기가 결합하여 라이소자임에 내성을 보이는 것으로 알려져 있고, *E. faecalis*는 라이소자임을 인식하여 sigma factor인 SigV를 유리시키고, 유리된 SigV가 RNA 중합효소에 결합하여 라이소자임 내성 관련 유전자들을 발현시켜 고농도의 라이소자임에 대해서도 내성을 보이는 것으로 알려져 있다 [3, 29]. 난백은 수분이 88%이고, 11%가 단백질이며, 단백질을 100으로 할 때 라이소자임은 3.5%가 존재하는 것으로 알려져 있다 [1, 18]. 본 연구에서는 난백에서 정제한 라이소자임뿐만 아니라 닭과 오리 난백의 항균효능을 측정하였는데, 예상한 대로 *S. aureus*는 192~384배의 희석배수에서, *E. faecalis*는 48~32배의 희석배수에서 감수성을 보여 높은 내성을 보였다. *Streptococcus uberis*는 난백에 대해 100배 이상의 희석배수에서 감수성을 보였지만 검사한 최고농도의 라이소자임에 대해서도 감수성이 전혀 없었다. 이에 반해, *S. chromogenes*, *S. hemolyticus*, *K. rosea* 및 *L. garvieae*의 경우 라이소자임에 대해 상대적으로 높은 감수성을 보였다. 평가에 사용한 라이소자임은 실제 난백에 존재하는 농도보다 높은 농도를 사용하였는데, 모든 경우에서 닭의 난백이 라이소자임 대비 높은 항균효능을 보였다. 이러한 이유는 라이소자임 이외에도 gallin과 같은 항균 펩타이드가 존재하기 때문이며 [10], 유방염 치료에 대한 난백의 잠재적 유용성을 시사하는 부분이다.

결론적으로, 주요 원인균을 제외한 유방염 원인균의 빈도는 농장, 국가, 항생제 사용 이력에 따라 차이를 보이고, 파이로시퀀싱법을 사용하여 유방염 원유 내 마이크로바이옴을 연구하는 경우, 더욱 다양한 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 또한 유방염 원인균에 대한 난백의 감수성을 확인하였고, 기존 항생제에 난백을 병용하는 경우 항생제 내성균 저감에 도움이 될 것으로 기대되나, 난백을 실제 유방염 치료에 이용하기까지는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ010855)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

1. Abeyrathne EDNS, Lee HY, Ahn DU. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents-a review. *Poult Sci* 2013, **92**, 3292-3299.
2. Ben-Ami R, Navon-Venezia S, Schwartz D, Schlezinger Y, Mekuzas Y, Carmeli Y. Erroneous reporting of coagulase-negative staphylococci as *Kocuria* spp. by the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol* 2005, **43**, 1448-1450.
3. Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W, Götz F. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan *O*-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2005, **55**, 778-787.
4. Bhatt VD, Ahir VB, Koringa PG, Jakhesara SJ, Rank DN, Nauriyal DS, Kunjadia AP, Joshi CG. Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. *J Appl Microbiol* 2012, **112**, 639-650.
5. Chun J, Kim KY, Lee JH, Choi Y. The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. *BMC Microbiol* 2010, **10**, 101.
6. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2006.
7. de Oliveira GB, Favarin L, Luchese RH, McIntosh D. Psychrotrophic bacteria in milk: how much do we really know? *Braz J Microbiol* 2015, **46**, 313-321.
8. Delgado S, Rachid CTCC, Fernández E, Rychlik T, Alegría A, Peixoto RS, Mayo B. Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food Microbiol* 2013, **36**, 103-111.
9. Glynn AA. Lysozyme: antigen, enzyme and antibacterial agent. *Sci Basis Med Annu Rev* 1968, 31-52.
10. Gong D, Wilson PW, Bain MM, McDade K, Kalina J, Hervé-Grépinet V, Nys Y, Dunn IC. Gallin; an antimicrobial peptide member of a new avian defensin family, the ovodefensins, has been subject to recent gene duplication. *BMC Immunol* 2010, **11**, 12.
11. Hamady M, Lozupone C, Knight R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J* 2010, **4**, 17-27.
12. Hogeveen H, Huijps K, Lam TJ. Economic aspects of mastitis: new developments. *N Z Vet J* 2011, **59**, 16-23.
13. Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 2004, **20**, 2317-2319.
14. Hur M, Kim Y, Song HR, Kim JM, Choi YI, Yi H. Effect of genetically modified Poplars on soil microbial communities during the phytoremediation of waste mine tailings. *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**, 7611-7619.
15. Kim JH, Ko MJ, Kim KH, Lee SH, Choi SS. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* sp. isolated from bovine milk. *Korean J Microbiol* 2010, **46**, 341-345.
16. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012, **62**, 716-721.
17. Kojima H, Fukui M. *Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake.

- Int J Syst Evol Microbiol 2011, **61**, 1651-1655.
18. **Kovacs-Nolan J, Zhang JW, Hayakawa S, Mine Y.** Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. J Agric Food Chem 2000, **48**, 6261-6266.
 19. **Lee ES, Kang HM, Chung C, Moon JS.** Antimicrobial susceptibility and prevalence of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis. Korean J Vet Res 2007, **47**, 67-75.
 20. **Masoud W, Vogensen FK, Lillevang S, Abu Al-Soud W, Sørensen SJ, Jakobsen M.** The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. Int J Food Microbiol 2012, **153**, 192-202.
 21. **Nam HM.** Current situation of mastitis and relative frequency of pathogens isolated from subclinical mastitis in dairy cattle in Korea. Korean J Vet Public Health 2010, **34**, 265-272.
 22. **Nam HM, Lim SK, Jang GC, Joung DY, Kim H, Lee CS, Jung SC.** Culture results from quarter milk samples submitted to veterinary diagnostic laboratories during January~November 2012 in Korea. J Prev Vet Med 2013, **37**, 111-119.
 23. **Oikonomou G, Machado VS, Santisteban C, Schukken YH, Bicalho RC.** Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. PLoS One 2012, **7**, e47671.
 24. **Osborne AD, Armstrong K, Catrysse NH, Butler G, Versavel L.** An outbreak of pseudomonas mastitis in dairy cows. Can Vet J 1981, **22**, 215-216.
 25. **Quigley L, O'Sullivan O, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD.** Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. Int J Food Microbiol 2011, **150**, 81-94.
 26. **Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD.** The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiol Rev 2013, **37**, 664-698.
 27. **Rodrigues MX, Lima SF, Higgins CH, Canniatti-Brazaca SG, Bicalho RC.** The *Lactococcus* genus as a potential emerging mastitis pathogen group: A report on an outbreak investigation. J Dairy Sci 2016, **99**, 9864-9874.
 28. **Tarlera S, Denner EBM.** *Sterolibacterium denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel cholesterol-oxidizing, denitrifying member of the β -*Proteobacteria*. Int J Syst Evol Microbiol 2003, **53**, 1085-1091.
 29. **Varahan S, Iyer VS, Moore WT, Hancock LE.** Eep confers lysozyme resistance to *Enterococcus faecalis* via the activation of the extracytoplasmic function sigma factor SigV. J Bacteriol 2013, **195**, 3125-3134.
 30. **Vernon CA.** The mechanisms of hydrolysis of glycosides and their relevance to enzyme-catalysed reactions. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1967, **167**, 389-401.
 31. **Watts JL.** Etiological agents of bovine mastitis. Vet Microbiol 1988, **16**, 41-66.
 32. **Zadoks RN, Watts JL.** Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. Vet Microbiol 2009, **134**, 20-28.
 33. **Zhen YH, Jin LJ, Li XY, Guo J, Li Z, Zhang BJ, Fang R, Xu YP.** Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol 2009, **133**, 317-322.