

돼지 정액내의 오염 세균의 동정 및 오염된 세균의 제거

박춘근¹, 홍기훈, 이용승¹, 한태욱*
강원대학교 수의학부대학, 동물생명과학대학¹
(접수 2008. 12. 16, 게재승인 2008. 12. 27)

Identification of bacterial contaminants in porcine semen and its removal

Choon-Keun Park¹, Ki-Hun Hong, Su-Jung Son, Yong-Seung Lee¹,
Tae-Wook Hahn*

School of Veterinary Medicine, College of Animal Life Sciences¹, Kangwon National
University, Chuncheon, 2007-701, South Korea

(Received 16 December 2008, accepted in revised form 27 December 2008)

Abstract

Bacteriospermia is a frequent finding in fresh boar semen and can result in detrimental effects on semen quality and longevity. The objectives of this study was to evaluate types of bacterial contaminants in porcine fresh semen and the reducing effect of antibiotic and density gradient with percoll on the bacterial contaminants. Fresh semen was collected by gloved-hand method into a pre-warmed (37°C) thermostable bottle, and was inoculated onto blood agar and MacConkey agar, respectively. After incubated for 48 hour, 7.5% CO₂ at 37°C, bacterial colonies were selected and identified by Gram staining, oxidase test, catalase test and finally identified using API kits and Vitek system. Aerobic culture yielded a variety of bacteria from different genera. The most prevalent contaminant of fresh semen were *Leclecia adecarboxylata*, *Acineobacter banmanni*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii* spp *urealyticus*, *Proteus mirabilis*. Most of identified bacteria were Gram (-) and non-pathogenic bacteria. It seems that bacterial contaminants in fresh semen were seem originated from multiple sources at the stud/farm, and were from animal and non-animal origins. Gentamicin treatment did not eliminate the bacterial contaminants completely but 3 step-density gradient with percoll completely removed the bacterial contaminants in fresh semen.

*Corresponding author :

Phone : +82-33-250-8671, Fax : +82-33-244-2367

E-mail : twahn@kangwon.ac.kr

Therefore, future study is necessary to prove that density gradient method with percoll can eliminate bacteria in fresh semen without significantly affecting sperm viability or function.

Key words : Porcine semen, Bacterial contaminant, Percoll, Density gradient

서 론

우리나라에서 돼지 인공수정이 본격적으로 보급되기 시작한 1994년에는 허가된 인공수정 센터는 5개소였으며, 인공수정 보급률이 약 3% 정도였으나, 10년이 지난 2004년도에는 인공수정 센터의 수가 56개소로 증가하였으며, 인공수정 보급률 또한 80% 이상으로 국내 양돈 사업에서의 인공수정의 보급이 확산되어 종축개량과 산자수 향상 등의 양돈사업의 발전을 이끌었다. 인공수정의 장점은 우선 유전적으로 우수한 종모돈을 이용함으로써 종돈장내외, 혹은 돈군의 대소에 관계없이 활용케 함으로써 종축개량 향상에 도움을 주었으며, 번식피크기에 종모돈의 종부빈도를 감축시킬 수 있어 종모돈 필요 두수도 감축할 수 있게 되어 경제적 이익을 증대시켰다. 또한 폐쇄돈군으로 육성시킬 수 있어 병원체의 유입을 방지하며, 대형돈과 소형돈 간의 교배가 가능하고, 발정동기화를 시킨다면 번식을 위한 능력을 경감할 수 있는 이점을 가지고 있어 양돈사업의 발전에 기여하였다.

일반적으로 정액 중에는 상당수의 세균이나 바이러스가 발견된다. 이는 정액채취용 종모돈이 질병에 감염되어 나타나거나 또는 종모돈의 피부나 포피, 그리고 주위환경의 오염에 기인되고 있다¹⁻⁷⁾. 특히 정액채취과정이나 정액의 희석 및 제조과정에서 많은 세균들이 오염될 수 있다. 이러한 세균은 생존과 증식을 위해서 여러 가지 대사기질을 사용한 후 대사산물을 축적함으로써 정자의 생존기간을 단축시킬 뿐만 아니라 인공수정을 통하여 자궁내로 들어가 수정란의 생존에 영향을 미칠 수

있으며, 생식기 질병의 원인이 될 수 있다^{1,4,8)}.

일반적으로 세균의 종류나 수는 동물종 또는 정액제조환경에 따라 다소 차이를 나타낼 수 있는데 돼지 정액에서 흔히 발견되는 세균으로서 Althouse 등(2005)은 *Enterococcus* spp (20.5%), *Stenotrophomonas maltophilia* (15.4%), *Alcaligenes xylosoxidans* (10.3%), *Serratia marcescens* (10.3%), *Acinetobacter lwoffii* (7.7%), *Escherichia coli* (6.4%), *Pseudomonas* spp (6.4%) 및 기타 세균 (23.0%)이 분리된다고 보고하였다⁹⁾. 이러한 세균오염은 웅돈에서 유래하는 것 이외에 정액을 채취할 때 오염된 포피 등을 비롯한 환경에서 유래된 것으로 보고되고 있고 다양한 종류로 나타나고 있다^{5,7)}. 이와 같은 세균에 감염시 질병 전파 및 수태율 저하의 원인이 될 수 단점이 있기에 인공수정센터에서 생산되고 판매되는 정액은 tetracycline과 같은 세균의 성장과 번식을 일시적으로 정지시키는 정균작용을 하거나 penicillin, streptomycin, neomycin 및 kanamycin 등과 같은 살균성 항생제 등을 이용하여 정액 내 세균의 활성을 억제하고 있다^{10,11)}. 이러한 항생제는 세균의 단백질 합성을 억제시켜 세균의 증식을 억제시키거나 살균 작용을 하는데 이러한 작용들은 정자에도 영향을 미치게 된다. 따라서 시판되는 정액내의 항생제의 첨가는 정자에 영향을 미치지 않은 범위에서 소량 넣기 때문에 정액 내 모든 세균을 억제하지 못하게 되고, 그로 인해 인공수정을 통한 질병이입의 위험을 떠안게 되었다. 또한 항생제 남용으로 인한 항생제 내성균의 생성은 돼지고기를 식용으로 하는 사람에게 문제를 일으키게 된다.

이와 같이 정액내의 항생제의 사용을 줄이기 위하여 정액내에 항생제를 첨가하는 대신 세균

을 물리적으로 제거하는 방법이 사용되고 있는데 이러한 방법을 정자 분리법이라고 한다. 정자분리법에는 washing 방법, sperm migration 방법, density gradient 방법, adherence 방법 등이 보고되었다¹²⁾. 본 연구에서는 미니어쳐 돼지를 생산하기 위한 인공수정용 정자를 사용하기 위해 강원대학교 농장에서 육성하고 있는 미니 돼지 2두와 일반 종돈장 5곳에서 수집한 정액내에 오염되어 있는 세균종을 분석하고 항생제처리 및 percoll을 사용한 density gradient 방법을 이용하여 정액 내에 오염된 세균이 얼마나 제거되는지를 알아보려고 수행하였다.

재료 및 방법

돼지 정자의 분리

2007년도 강원대학교 목장에서 육성하고 있는 미니어쳐 돼지 2마리의 정액은 gloved-hand method를 통해 37°C로 예열된 보온병에 수집하였다⁸⁾. 또한 강원도 지역에 위치한 5곳의 AI센타에서 수집한 정액을 본 연구의 실험재료로 사용하였다. 수집한 정액은 냉장 상태로 실험실로 옮긴 후 당일 세균 배양을 실시하였다.

세균배양 및 동정

수집한 정액은 5% 양혈액이 첨가된 혈액배지(코메드, 한국)와 MacConkey agar (Difco, USA)에 각각 도말하였고 37°C, 7.5% CO₂배양기에서 28~48 시간 동안 배양하였다. 서로 다른 모양의 집락을 모두 선택하여 새로운 혈액배지에 접종한 뒤 세균 동정을 실시하였다. Gram 염색법, oxidase test, catalase test를 이용하여 동정할 균의 범위를 스크리닝한 후, API kit (bioMérieux, France)와 Vitek system (bioMérieux)을 이용하여 최종 균을 동정하였다.

정액의 항생제 처리

항생제 처리 전후 정액내의 세균종의 변화를 관찰하기 위해 두 마리의 미니어쳐 돼지의 정액을 채취하였다. 채취한 정액을 이등분으로 나누는 뒤, 항생제 처리전과 항생제 처리후로 구분하여 실험하였다. 항생제 처리전의 정액은 바로 혈액배지와 MacConkey agar에 직접 도말하였다. 항생제는 정액내 세균을 정균 또는 살균시키기 위한 항생제로 흔히 사용하는 gentamicin을 사용하였다. Gentamicin sulphate (Duchefa, Netherlands)를 멸균된 증류수로 4 mg/ml로 용해시킨 후 정액 1 ml당 2mg의 gentamicin이 되도록 처리한 후 혈액배지와 MacConkey agar에 접종하였다.

Percoll 처리 후 집락수의 측정

Percoll (Sigma-Aldrich, Germany)과 10X 인산완충용액 (PBS)을 9:1로 희석하여 (삼투압 300 Osm) 100% Percoll로 간주하고 PBS로 Percoll을 30, 50, 65, 80, 95%로 희석하였다. Percoll 단일층 (single step)의 경우 원심관에 각각 30, 65, 80%의 Percoll 희석액을 분주한 후 채취한 정액을 첨가하였으며, 3 step의 경우 Percoll 희석액을 원심관에 30:65:90%의 농도구배로 분주한 후 정액을 첨가하였고, 5 step의 경우 Percoll 희석용액을 30:50:65:80:90%로 농도구배로 분주한 후 정액을 첨가하였다. 각각의 샘플을 400 xg에서 20분간 원심분리를 실시하였다. 각 층에 있는 정액을 채취한 후 Percoll을 제거하기 위해 0.1% Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich)이 첨가된 PBS로 2회 세척하였다. 세척 후 정액을 PBS로 십진 계단 희석한 뒤 100 μ l씩 혈액배지에 도말한 후 37°C, 7.5% CO₂배양기에서 24-48 시간 배양하였다. 배양 후 총 세균수를 colony forming unit (cfu/ml)로 측정하였으며, 증식된 균을 전술한 방법에 의해 균동정을 실시하였다.

결 과

정액내에서 균의 분리 동정

Table 1은 미니어쳐돼지 2마리 (M7, M1120)와 5곳의 종돈장에서 수집한 돼지 정액에서 분리한 세균 동정을 실시한 결과이다. M7 미니어쳐 돼지 정액의 경우 8종류가, M1120 미니어쳐 정액의 경우 6종류가 검출되었다. 종돈장의 경우, Duroc 종돈 D51과 D75의 경우 각각 1종류의 균이 검출되었고, Landrace 종돈 L14와 L118은 3종류의 세균이 분리되는 반면에 L111은 한 종류의 세균만 관찰되었다. Yorkshire 종돈인 Y30과 Y93의 경우 모두 3종류의 세균이, 그리고 Y2종돈의 경우 한 종

류의 세균이 검출되었다.

검사한 원정액에서 발견되는 균종에 있어서는 뚜렷한 공통점은 발견하지 못하였고, 다양한 균종이 각각 관찰되었으나 *Staphylococcus* spp와 *Proteus* spp 순으로 빈번하게 검출되었다. 종돈장의 정액들의 세균종은 개체에 따라 차이를 보이긴 했으나, 미니어쳐 돼지의 정액에 비하여 비교적 적은 종의 세균이 동정되었으며, 빈도를 보았을 때, *Leclecia adedecarboxylata*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii* spp *urealyticus* 균이 2번 이상 공통적으로 동정되었다.

Table 1. Identified bacterial species from semen analyzed

Breed	Sample ID	Bacteria (number of bacterial types)
Miniature pig	M7	<i>Acineobacter baumannii/calcoaceticus</i> , <i>Budvicia apuatica</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Schewanella putrefaciens</i> group, <i>Staphylococcus cohnii</i> spp <i>urealyticus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. mendocina</i> (8)
	M1120	<i>Acineobacter baumannii/calcoaceticus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Myroides</i> spp, <i>Pasteurella pneumotropica</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (6)
Duroc	D51	<i>Leclecia adedecarboxylata</i> (1)
	D75	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)
Landrace	L111	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (1)
	L118	<i>Leclecia adedecarboxylata</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> spp <i>urealyticus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> (3)
	L14	<i>Leclecia adedecarboxylata</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> spp <i>urealyticus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> (3)
Yorkshire	Y2	<i>Pasteurella pneumotropica</i> (1)
	Y30	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Leclecia adedecarboxylata</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> (3)
	Y93	<i>Acineobacter baumannii/calcoaceticus</i> , <i>Klebsiella pneumotropica</i> , <i>Proteus mirabilis</i> (3)

항생제 처리 전후의 미니어쳐 돼지 정액의 변화

Table 2는 Table 1에서 가장 세균종이 많은 미니어쳐 돼지의 정액을 대상으로 항생제 처리 전후의 세균종의 변화를 비교한 결과이다. 두 마리의 미니어쳐 돼지에서 채취한 정액을 가지고 항생제 처리 전후의 균종의 변화를

관찰하였다. M7정액과 M1120정액내 세균의 종류는 각각 8종과 7종으로 나타났다. 그리고 두 원정액에서 공통적으로 관찰되는 세균은 *Acinetobacter*를 포함해서 모두 4종류의 세균이 관찰되었다.

항생제 처리 후 M7정액 (M7D)에서는 2종의 세균이 관찰되었고 항생제처리후 M1120

정액(M1120D)에서는 항생제처리시 5종이 감소된 2종류의 세균이 검출되었다. 따라서 항

생제를 처리해도 정액내 오염된 세균을 모두 제거하지 못함을 알 수 있었다.

Table 2. Identified bacterial species in semen before and after treatment of gentamicin

Sample ID	Bacteria (number of bacterial species)
M7*	<i>Acineobacter baumannii/calcoaceticus</i> , <i>Enterobacter faecalis</i> , <i>Campylobacter coli</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Schewanella putrefaciens</i> group, <i>Staphylococcus cohnii</i> spp <i>urealyticus</i> , (8)
M7D	<i>Acineobacter baumannii/calcoaceticus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Schewanella putrefaciens</i> group, <i>Staphylococcus cohnii</i> spp <i>urealyticus</i> (5)
M1120	<i>Acineobacter baumannii/calcoaceticus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> spp <i>urealyticus</i> (6)
M1120D	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> spp <i>urealyticus</i> (2)

*M7 and M1120: fresh semen, M7D and M1120D: semen after gentamicin treatment.

Percoll을 처리 전후 cfu 측정 및 세균총의 변화

가장 균이 많이 검출된 미니어처 돼지에서 채취한 원정액(M7)을 percoll 30%, 65%, 80%의 single step으로 추출한 정액, 그리고 3 step (30:65:90), 5 step (30:50:65:80:90)의 percoll의 처리를 한 후 검출되는 세균의 cfu 값을 비교해 보았다 (Table 3). 본 시험 결과의 재현성을 보고자 총 5회 반복 실시하였다. Swarming되는 세균을 억제시키기 위해 Blood agar외에 MacConkey agar에 접종한 후 cfu를 비교하였을 때 MacConkey agar에서는 일반적으로 100개 정도 낮은 cfu가 관찰

되었다. M7돼지 원정액의 경우 5회의 걸쳐 채취한 원정액의 세균수는 $1.8 \times 10^3 \sim 7.8 \times 10^6$ cfu/ml을 나타내어 채취할 때 마다 상당한 균수의 편차가 있는 것이 관찰되었다. 동일한 원정액을 30% percoll을 처리하였을 때 $3.7 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^6$ cfu/ml로 원정액의 세균수에 비해 별로 감소되지 않은 것으로 나타났다. 그러나 65% percoll을 처리한 경우 5회중 1회가 40 cfu로 검출되었고 80% percoll 처리시 5회중 1회에 한해 10 cfu의 균이 검출되었고 5 step 처리시에는 5회중 2회에 한해 10 cfu의 균이 검출되었다. 3 step의 경우에는 5회 모두 균이 검출되지 않았다.

Table 3. Bacterial number after different treatments with percoll

Trial	Fresh semen (M7)	Single step			3 step	5 step
		30%	65%	80%	30:65:90	30:50:65:80:90
1st	7.8×10^6	1.5×10^6	0	0	0	0
2nd	2.2×10^5	4.9×10^3	0	0	0	0
3rd	3.4×10^4	4.8×10^3	40	0	0	10
4th	1.8×10^3	3.7×10^3	0	0	0	0
5th	5.7×10^3	6.3×10^3	0	10	0	10

* cfu was measured on blood agar.

Percoll처리후의 증식된 세균의 종류를 동정한 결과는 Table 4에 나타났다. 원정액과 percoll 처리한 30%, 60%, 85% single step 처리정액과 5 step에서의 추출한 정액에서 증식한 균동정 결과를 비교하였다. Percoll처리

전의 세균의 종류가 8종에 비해 처리 후 동정된 세균의 종류가 감소한 것으로 나타났고 5 step의 경우 6종인데 비해 30, 65, 80% single step의 경우 균종은 각각 4, 2, 2종으로 감소되는 것으로 나타났다.

Table 4. Identification of contaminant bacteria in semen before and after density gradient with percoll

Sample ID	Bacteria (number of types)
Fresh semen	<i>Acineobacter baumannii/calcoaceticus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Enterobacter faecalis</i> , <i>Leclecia adecarboxylata</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Schewanella putrefaciens</i> group, <i>Staphylococcus cohnii</i> spp <i>urealyticus</i> (8)
30%	<i>Acineobacter baumannii/calcoaceticus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (4)
65%	<i>Acineobacter baumannii/calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)
80%	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> (2)
3 step	Not tested
5 step	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Enterobacter faecalis</i> , <i>Leclecia adecarboxylata</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Schewanella putrefaciens</i> group, <i>Staphylococcus cohnii</i> spp <i>urealyticus</i> (6)

고 찰

돼지 정액내에 세균이 정상적으로 존재하며 최고 10^9 cfu/ml까지 존재할 수 있다고 보고되고 있다. 그러나 이러한 오염된 세균의 존재가 정자에 미치는 영향에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

세균의 종류를 판별한 다음 실험에서는 지금까지 보고된 균들이 다소 발견되었다. Althouse 등⁹⁾의 보고에 따르면 *Enterococcus* spp (20.5%), *Stenotrophomonas maltophilia* (15.4%), *Alcaligenes xylosoxidans* (10.3%), *Serratia marcescens* (10.3%), *Acinetobacter lwoffii* (7.7%), *Escherichia coli* (6.4%), *Pseudomonas* spp (6.4%), 그리고 기타 세균 (23.0%)으로 발견되었는데, 이 결과를 본 실험

험중 종돈장의 정액샘플의 세균을 동정하여 비교해본 결과 Table 1에서 나타난 균종과 검출빈도에 있어서 차이가 있었으나, 공통적으로 관찰되는 균도 상당수 있음을 알 수 있었다. 또한 병원성을 띄는 세균이기보다는 사육장소등의 환경의 영향을 받거나 조작과정중에 오염되었다고 여겨지는 세균이 대부분이었다.

Percoll gradient를 이용한 정자분리법은 운동성 있는 정자를 분리하는 다양한 방법들 중 하나이다. Polyvinylpyrrolidone (PVP)으로 코팅된 silica particle 은 Percoll 이라는 이름으로 상업적으로 제조, 판매되었다. Percoll은 배양액을 첨가하여도 삼투압의 변화가 없으며, 높은 밀도구배 배양액을 만들 수 있으며, 용액이라기보다는 colloid로 낮은 점성을 가지

기 때문에 원심분리시 정자가 percoll 층을 통과하는데 방해가 되지 않는 등의 몇 가지 장점들을 가지고 있다. 본 연구에서는 정자분리 방법의 하나인 percoll 법을 이용시 세균의 오염정도를 알아보는 데 목적을 두고 수행되었다. Percoll처리 후 cfu를 측정 한 실험에서는 검사에 이용한 배지의 종류 (blood agar, Mac-Conkey agar)에 따라 수치에는 차이가 있었으나, percoll의 농도가 높아질수록 측정되는 cfu의 값이 감소되는 양상은 동일했으며, 특히 30%에서까지 다소 많은 수치로 측정되던 cfu값이 65% 농도에서는 0의 값을 나타내는 것으로 보아 30%~65% 농도사이에서 세균이 이동하지 못하는 적정농도가 있을 것으로 판단된다. 이는 추후 농도간격을 더욱 작게 설정하여 실험을 할 필요성이 있다고 보여진다. 미니어처 돼지에 있어서 항생제를 첨가한 정액(M7D, M1120D)과 첨가하지 않은 원정액(M7, M1120)을 비교하였다 (Table 2). M7D와 M7 정액에서 증식된 세균의 종류를 비교하였을 때, 검출되는 균의 종류는 동일하였으나, 공통적으로 검출되는 균은 *Acineobacter baumannii*, *Shewanella putrefaciens* group의 2종뿐이었다. M1120D와 M1120 정액에서 검출된 세균의 비교에서는 검출되는 세균의 종류는 각각 6종 및 2종으로 뚜렷한 차이가 있었다.

항생제의 경우 초기에는 주로 penicillin과 streptomycin을 주로 사용하였으나 점차 이들 항생제에 대한 내성균이 증가됨에 따라 gentamicin과 같은 광범위 항생제를 가장 많이 사용하고 있다⁸⁾. 본 연구에서는 gentamicin을 사용하였으나 정액내에 오염된 세균을 완전히 제거하지는 못했다.

항생제를 사용한 정액에서는 단 2종만이 검출된 반면, 그렇지 않은 M1120 원정액에서는 무려 7종의 세균이 검출되었다. 또한 공통적으로 관찰되는 세균은 없었다. 정액에 첨가한 항생제는 kanamycin으로 검출되는 세균종과 숫자에 있어서 영향을 끼쳤으리라 여겨졌다. 이어서 항생제를 처리한 M7정액에 있어서 percoll 농도와 단계층이 존재하는 3 step,

5 step에 따라 균종에 어떠한 차이가 있는지 비교해 보았다. Percoll을 넣지 않은 원정액인 M7과 비교하였을 때, percoll 처리농도가 높아짐에 따라 동정되는 세균의 종수가 감소함을 볼 수 있었다. 검출되는 균종은 M7에서 검출되었던 균종과 거의 일치하는 경향을 보였으며, percoll의 농도가 균이 정액을 통과하는데 장애를 줄 수 있음을 추론할 수 있었다. 돼지정액의 분리과정에 있어서는 본 연구에서도 그렇듯이 정액자체의 세균이 동정된 다기보다는 조작과정상의 오염, 환경에 상재하는 세균, 조작자로부터 기인되는 세균등 오염경로가 다양한 세균들이 동정이 되었다. Althouse 등^{8,9)}에 의하면 분변, 피부, 피모, 호흡기분비물, 조작자의 피부, 호흡기등 인체로부터 기인된다고 여겨지는 다양한 경로를 서술하고 있다. 또한 정자분리에 이용하는 항생제의 종류를 비롯, 환경온도, 배양배지의 pH 등 여러 요인이 세균의 배양, 동정에 영향을 미친다는 사실도 확인할 수 있다. 그래서 조작시 여러 겹의 글로브를 착용하거나, 환경내의 소독을 정기적으로 시행하는 등 연구과정 중의 오염을 최소화할 수 있는 실험방법이 권장되고 있다.

결 론

본 연구는 미니어처 돼지의 생산을 위해 2007년 강원대학교 목장에서 사육되고 있는 2두의 미니어처 돼지와 강원도 지역 5곳의 종돈장에서 사육하고 있는 종돈에서 채취한 정액내에 오염된 세균의 분포를 조사하였고 항생제처리와 percoll을 이용한 density gradient 방법에 의해 오염된 세균이 제거되는 정도를 관찰하였다. 채취한 정액은 혈액배지와 MacConkey agar에서 접종한 후 7.5% CO₂, 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양한 집락은 Gram 염색, oxidase 및 catalase 검사를 거쳐 최종적으로 API kit와 Vitek system을 이용하여 동정하였다. 다양한 종류의 균이 관찰되었으며 그중 *Leclecia adecarboxylata*, *Acineobacter ban-*

manni, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus coeni* spp *urealyticus*, *Proteus mirabilis* 가 다소 높은 빈도로 관찰되었다. 또한 돼지에서 유래한 균보다는 환경에서 유래한 균이 더 많이 관찰되었다. 오염된 균을 제거하기 위해 가장 흔하게 사용하는 gentamicin을 처리하였으나 오염균을 완전히 제거하지 못하였다. 그러나 percoll을 이용한 density gradient 방법 중 3 step 방법에서는 정액내의 오염균을 완전히 제거되는 것으로 나타났다. 추후 원정액과 percoll 처리한 정액에 있어 정자의 수정능과 관련한 연구가 이루어진다면, 정자분리 과정에 percoll을 적용하는 방법의 효용성 판단에 많은 도움을 주리라 판단된다.

사사의 글 : 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 20070301034040)의 지원과 강원대학교 동물의학종합연구소 및 동물자원공동연구소의 시설지원에 의해 이루어졌음.

참고문헌

1. Althouse GC, Kuster CE, Clark SG. 1998. Contaminant growth of spermicidal bacteria in extended porcine semen. In: Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress 2 : 37.
2. Dagnall GJR. 1986. An investigation of the bacterial flora of the preputial diverticulum and of the semen of boars. M.Ph. thesis, Royal Veterinary College, Hertfordshire.
3. Danowski KM. 1989. Qualitative and quantitative investigation of the germ content in boar semen and the antibiotic sensitivity of the prevailing germ spectrum. Dr Med Vet Inaugural Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
4. Kuster CE, Althouse GC. 1997. Sperm agglutination of extended semen caused by gentamicin-resistant bacteria. In: Proceedings of the 28th AASP Meeting : 293-295.
5. Sone M, Kawarasaki T, Osaga A, et al. 1989. Effects of bacteria-contaminated boar semen on the reproductive performance. *Jpn J Anim Reprod* 35 : 159-164.
6. Sone M. 1990. Investigations on the control of bacteria in boar semen. *Jpn J Anim Reprod* 36 : 23-29.
7. Tamuli MK, Sharma DK, Rajkonwar CK. 1984. Studies on the microbial-flora of boar semen. *Indian Vet J* 61 : 858-861.
8. Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, et al. 2000. Field investigations of bacterial contaminations and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 53 : 1167-1176.
9. Althouse GC, Lu KG. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63 : 573-584.
10. Sone M. 1982. Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. *Vet Rec* 111 : 11-14.
11. Althouse GC. 1997. Comparison of currently used semen extenders in the swine industry. *Comp Cont Ed Prac Vet* 19 : 777-782.
12. Mortimer D. 2000. Sperm preparation methods. *J Androl* 21 : 357-366.