

돼지 액상정액 보존 일수에 따른 정액내 세균과 정자 기능의 변화

정기화[†] · 김인철^{**}

경남과학기술대학교 동물소재공학과

Effects of Storage Time on Bacteria Concentration and Sperm Parameters in Boar Semen

Ki-Hwa Chung[†] and In-Cheol Kim

Department of Animal Resources Technology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to determine the relationship between elapsed time after semen preservation on the changes of bacteria and semen quality. Semen was diluted with BTS(Beltsville Thawing Solution) extender without antibiotic for 7 days and sperm parameter and fertility were measured. Sperm motility was measured by CASA and total bacteria number was counted after 22~24 hr incubation from counting agar plate in which sperm dilute to $10 \sim 10^6$ in 0.9% saline solution and inoculate to agar. Acrosomal integrity was measured by Chlortetracycline (CTC) staining. CTC patterns were uniform fluorescence over the whole head (pattern F), characteristic of incapacitated acrosome-intact spermatozoa; fluorescence-free band in the post-acrosomal region (pattern B), characteristic of capacitated acrosome-intact spermatozoa; and almost no fluorescence over the whole head except for a thin band in the equatorial segment (pattern AR), characteristic of acrosome reacted spermatozoa. Total number of bacteria was significantly increased ($p < 0.0001$) 3 days after preservation. Sperm motility, viability, and morphological abnormality on elapsed time after preservation were lower from 5 (77.24 ± 6.47 , $p < 0.001$) and 7 days (77.24 ± 6.47 , $p < 0.001$) after preservation compared to 1 (15.71 ± 7.18) and 3 days (18.39 ± 7.22) after preservation, respectively. Sperm viability was significantly lower (53.25 ± 35.03 , $p < 0.0001$) at 7 days after preservation. Morphological abnormality of sperm was lower ($p < 0.001$) at 1 (15.71 ± 7.18) and 3 (18.39 ± 7.22) days compared to 5 (21.84 ± 7.91) and 7 (22.59 ± 9.93) days after preservation. Acrosomal integrity and capacitation rate (pattern F) were significantly lower ($p < 0.001$) from 5 days after preservation. Based on the data we obtained from this study suggested that semen preserved more than 5 days without antibiotic would not recommend use for artificial insemination.

(Key words : Semen preservation day, Bacterial contamination, Sperm parameter test)

서 론

돼지 번식에서 인공수정이 차지하는 비율은 세계적으로 매년 증가하고 있으며, 국내의 경우 약 90%의 보급률로서 매년 180만여 팩의 정액이 소요되는 데(Kim 등, 2011) 대부분을 액상정액에 의존하고 있다. 액상정액이 세균에 오염되면 품질 저하는 물론 회색정액의 보존성을 저하시키고, 감염된 병원성 세균은 암컷의 질병을 유발하는 원인이 된다고 알려져 있다(Maes 등, 2008). 돼지 번식에 있어서 정자의 수정능력은 생산성에 영향을 미치는

중요한 요인 중의 하나인데, 수정능력은 정자의 활력, 기형률, 기능적인 형태, 세균오염 정도 및 주입정자의 농도와 같은 정액의 질과 양에 의하여 영향을 받는다.

미국의 경우, 돼지정액에서 분리한 세균의 종류는 약 13종 이상으로 장내 세균이 주축을 이루고 있고, 장내 세균은 정자 기능을 저해하는 것으로 보고되었다(Sone, 1982). 국내의 조사에 의하면 인공수정센터에서 제공받은 회색 직전의 원정액 중 94.8%가, 회색정액은 19.0%가 세균에 오염되었으며, 이들 세균을 분리한 결과, 10종의 그람 음성균과 5종의 그람양성균이 분리되었다고 하였다(Jung 등, 2011). 저자 연구실의 선행 연구에서 액상정액의 보존

* 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ9070642011) 및 2012년도 경남과학기술대학교 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

** 농촌진흥청 축산과학원 양돈과(Swine Science Division, NLRI, RDA).

[†] Corresponding author : Phone: +82-55-751-3287, E-mail: kchung@gntech.ac.kr

일수가 3일까지는 차이가 없었으나, 5일 이상일 경우 유의적인 세균의 증식을 확인하였다(이, 2007).

돼지 정액의 오염은 생식기 내부보다 외부의 요인이 주된 오염원으로 보고되었다(Althouse 등, 2000). 돼지 액상정액에 순수 배양된 여러 종류의 세균을 넣었을 때 정자 서로 간에 두부 응집이 일어나고, 전체적인 운동성이 감소되었다(Althouse, 1999)고 하며, 사람의 정액에서 항생체에 오랫동안 노출된 정자는 운동성과 형태에 영향을 받는다(Dahlberg, 1990)고 하였다. 세균에 오염된 정액은 세균 농도에 따라 유해성의 정도가 차이가 나는데, 보존 기간이나 주변의 청결도 및 희석액에 따라서 세균의 농도가 변하며, 오염된 정액을 이용하여 인공수정을 할 경우 축군 전체의 번식효율이 저하된다고 하였다(Althouse 등, 1998, 2000).

본 연구는 정액의 보존 일수에 따른 세균의 증식 정도를 조사하고, 정자의 기능에 미치는 영향을 구명하여 돼지 액상정액의 적정 보존일수를 제시하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시 정액 및 시약

실험에 공시한 액상정액은 돼지인공수정센터에서 사육 중인 두록종으로부터 채취한 정액으로 제조하였다. 항생제가 첨가되지 않은 BTS를 보존액으로 사용하였으며, 액상정액 제조 후 17°C의 정액 보관고에 담아 실험실로 운반한 후 공시하였다. 실험실에 운반된 액상정액은 17°C에서 7일간 보관하면서 세균과 정자의 기능을 조사하였다. 본 시험에 공시된 시약은 특별한 언급을 하지 않은 경우 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입한 제품을 사용하였다.

총 세균수 측정

인공수정센터에서 제공받은 정액 50 ml를 무균적으로 cornical tube에 옮겨 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 침전물을 10단계 희석법으로 희석한 뒤 희석된 시료를 plate counting agar에 접종하고 37°C 호기성 조건으로 24시간 배양하여 총균수를 측정하였다.

정자의 운동성 측정

정액의 운동성은 정자자동분석기(CASA, computer-assisted semen analysis, Medical Supply, Korea)를 이용하여 측정하였다. 정액 1.5 ml를 취하여 30분간 37°C 수조에 가온시키고, 37°C로 예열된 Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Israel) 위에 정액 10 μ l를 떨어뜨린 후 CCD 카메라(Veltek Korea)가 부착된 광학현미경(Olympus, Japan)에 연결된 SAIS system을 이용하여 분석하였다. 보관일수 1일, 3일, 5일, 7일에 정자의 운동성, 정자의 생존율, 정자의 기형을 그리고 정자 두부의 침체 검사를 실시하였다.

정자의 생존율과 기형을 조사

생존율과 기형을 조사를 위하여 Fast Green FCF 2.0 g과 Eosin B 0.8 g을 phosphate buffer 100 ml에 용해 후 끓인 다음 filter하여 염색액으로 사용하였다. 염색액 10

μ l를 slide glass에 떨어뜨린 후 정액 10 μ l를 염색액 위에 떨어뜨려 혼합한 후 cover glass를 이용하여 도말하였다. 도말된 slide glass는 신속히 말려 생존정자가 사멸 염색되는 것을 방지하고, 두부 염색 여부에 따라 생사를 판별하였다. 4개의 구획 중 25개씩 100개를 세어 그중 염색된 정자 수는 사멸정자로 판별하였고, 정자의 기형율도 4개의 구획 중 25개씩 100개를 세어 기형 정자 수를 판별하였다.

정자의 침체반응 조사

정자부유액 100 μ l에 2 μ l의 Hoechst 33258을 첨가하고 어두운 실온에서 3분간 정치시킨 후 1 μ l의 3% polyvinyl-pyrrolidone(PVP-40)를 첨가하여 실온에서 원심분리(400 \times g, 5분)하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 재부유시킨 정액과 chlortetracycline(CTC) 용액을 1:1로 혼합하여 30초 동안 염색하였다. 12.5%의 paraformaldehyde 8 μ l를 첨가하여 정자를 고정시킨 후 슬라이드글라스에 10 μ l를 떨어뜨려 DABCO와 혼합한 후 형광 현미경에서 정자의 두부 관찰하였다. 정자의 판별은 두부 전체와 미부 중편부에 밝은 형광염색이 된 것을 수정능 획득 및 침체반응이 일어나지 않은 정자(F), 뚜렷한 적도 부위와 미부 중편부 밝은 형광을 나타내고, 침체 후부는 어두운 것을 수정능력 획득은 일어났으나 침체반응이 일어나지 않은 정자(B), 두부 전체가 거의 염색되지 않은 정자를 침체반응이 일어난 정자(AR)로 판단하였다.

통계분석

실험결과와 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) Procedure를 적용하여 각 요인의 Least square means와 Standard error(SE)를 구한 후 요인간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

정액의 보존일수에 따른 정액 내 세균 오염도 변화

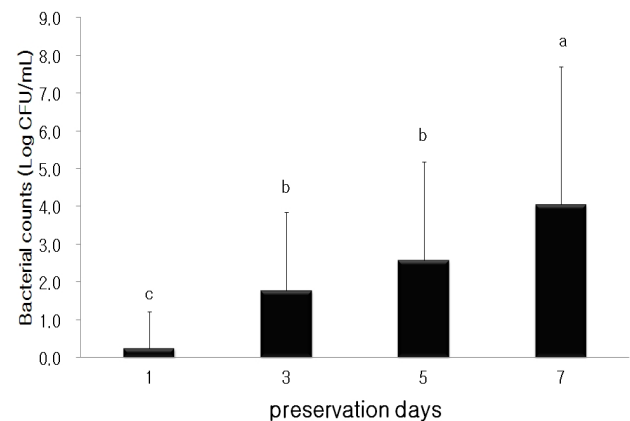


Fig. 1. Change of total bacteria numbers on preservation day in boar liquid semen without antibiotics. ^{a-c}Bar with different superscripts within treatments are significantly different($p < 0.01$).

Table1. Boar sperm parameters on increasing liquid semen preservation days without antibiotics

Preservation day	Sperm motility (%)	Viability (%)	Abnormality (%)
1	83.4±4.7 ^a	93.1±7.3 ^a	15.7±7.2 ^b
3	80.2±5.1 ^{ab}	85.7±22.3 ^a	18.4±7.2 ^{ab}
5	77.2±6.5 ^b	83.5±9.1 ^a	21.8±7.9 ^a
7	66.1±12.7 ^c	53.3±35.0 ^b	22.6±9.9 ^a

^{a-c} Values within columns with different superscripts are significantly different($p<0.01$).

정액의 보존일수의 증가가 정액 내 세균 변화에 미치는 영향을 구명하기 위하여 액상정액 제조 후 정액보관고에 보관하면서 보존일수별로 총세균 수를 조사한 결과는 Fig. 1에서 나타난 바와 같다. 정액은 세균이나 곰팡이가 잘 자랄 수 있는 최적의 환경요건을 갖추고 있다. 따라서 정액 제조시 세균이 조금이라도 있다면 보존 시간이 경과할수록 세균은 증식된다. 본 연구에서는 보존 3일째 유의적으로 증가하였고($p<0.01$), 7일째 또 한 번 유의적인($p<0.01$) 증가를 나타내었다.

정액의 오염원은 채취하는 수태지와 외부 환경으로 나눌 수 있는데, 수태지로부터는 음경포피액, 호흡분비물, 피부나 털로부터, 환경적인 요인으로는 물, 초자기구, 장비, 제조실 환경 및 제조하는 사람 등이 해당된다(Althouse 등, 1998; Althouse와 Lu, 2005). 정액이 오염될 경우, 정자의 구조와 기능의 변화하여 수태율 저하는 물론 산자수가 감소한다고 하였는데, Maroto Martin 등(2010)에 의하면 세균(*E. coli*)과 산자수 간에는 $-0.81(p<0.01)$ 의 상관관계를 나타낸다고 하였다.

따라서 정액의 채취시부터 제조 후 사용시까지 오염원을 차단하는 노력을 통하여 위생적인 정액으로 수정을 할 수 있어야 번식효율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

정액의 보존일수에 따른 정자의 성상 변화

정액의 보존일수의 변화가 정자의 기능에 미치는 영향을 구명하기 위하여 정자의 성상을 측정하고, 염색을 통하여 생존율과 기형율을 조사하였다. 정자의 운동성은 보존 5일차부터 77.24±6.47로 1일에 비하여 유의적 ($p<0.01$)으로 감소하였으며, 7일은 66.07±12.65로 5일에 비하여 유의적($p<0.01$)으로 감소하였다. 생존율은 5일까지 83.50±9.04로 유의적 변화를 나타내지 않았으나, 7일째에는 53.25±35.03으로 유의적($p<0.01$)으로 낮은 결과를 나타내었다. 기형율은 5일째부터 21.84±7.91% 이상으로 1일에 비하여 유의적($p<0.01$)으로 높은 결과를 나타내었다. 결과적으로 보존기간이 5일 이상일 경우 정자의 운동성과 기형율에 있어서 유의적($p<0.01$)으로 부정적인 결과를 나타내었다.

Sa 등(2011)은 국내 시판 중인 정액보존액 5개를 대상으로 한 실험에서 모든 보존액에서 보존 5일째에 유의적($p<0.05$)으로 정자의 활력이 저하하였다고 하여 본 실험과 동일한 결과를 보고하였다. 그러나 flow-cytometry를 이용한 정자의 생존율과 체외수정 후 배반포까지의 발달을 조사한 결과에서는 보존 10일째까지 유의적인 변화가

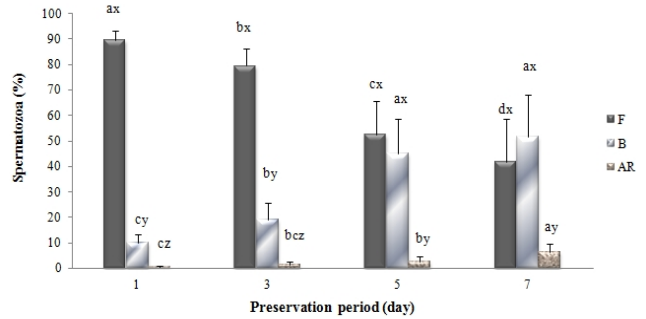


Fig. 2. Acrosomal integrity of boar spermatozoa on increasing preservation days without antibiotics. (F) uncapacitated, acrosome intact; (B) capacitated, acrosome intact; (AR) acrosome reacted. ^{a-c, x-z} Bar with different superscripts within treatments are significantly different($p<0.001$).

없었다고 하여 본 실험과는 상이한 결과를 나타내었다.

Britt 등(1999)은 정자의 운동성이 60% 이하일 경우 인공수정 후 수태율과 분만율이 저하한다고 하였으며, Johnson 등(2000)도 정자의 운동성이 60% 이상일 경우, 정상적인 수태율을 기대할 수 있다고 하였다. 본 시험에서는 7일 보존 이후에도 정자의 운동성이 60% 이상을 유지하고 있었으므로 수태율에는 변화가 없었을 것으로 사료된다.

기형 정자는 돼지 수태율과는 부의 상관 관계를 갖기 때문에(Gadea and Matas, 2000), 기형 정자의 비율이 20% 이상일 경우 번식률 저하를 나타낸다고 하여 인공수정용으로 이용하지 않는다. 본 시험에서는 보존일수 5일 이후에는 정자의 기형율이 20% 이상으로 나타나므로 5일 이상된 정자의 질이 저하된다고 사료된다.

정액의 보존일수에 따른 두부의 침체변화

정액의 보존일수에 따른 두부의 변화를 조사한 결과, 수정능 획득 및 침체반응이 일어나지 않은 정자(pattern F)의 비율이 1일차 89.7±3.3%에서 3일 79.5±6.7%, 5일 52.5±13.3%, 7일 41.8±16.8로 유의적인($p<0.001$) 감소를 나타내었다. 동시에 침체반응이 일어난 정자(pattern B)는 1일차 10.0±3.4%에서 3일차 19.1±6.7%, 5일차 45.1±13.7%로 유의적으로 증가하였다.

Dubea 등(2004)은 침체반응이 일어나지 않은 정자(pattern F)는 보존 12일 동안 90%에서 55%로 계속적으로 감소하였으며, 침체반응이 일어난 정자(pattern B)는 6%에서 40%로 계속적으로 증가하였다고 하여, 본 연구의 결과와 비슷한 경향을 보고하였다.

정자의 수정능력을 평가하는 방법은 정자의 운동성과 생존율은 물론 정자의 기능적인 형태 조사, DNA 측정, 난자의 투명대 투과반응, 난자침투율 및 체외수정 등 다양한 방법들이 이용되어지고 있다(Foxcroft 등, 2008). 정자의 기능에서 두부의 침체 변화는 정자의 수정능력을 평가하는 중요한 지표로서 활용되어지는 데, 포유동물에서 수정이 정상적으로 이루어지기 위하여 정자는 수정능을 획득하여야 하며 침체반응이 정상적으로 일어나야 한다(Austin, 1951). 그러나 수정능획득은 자연중부의 경우, 대부분 암컷의 생식기 내에서 정자가 이동하는 과정에서 일어나지만, 인공수정을 하기 이전에 반응을 하거나, 침

체 반응의 경우 난자를 만나기 이전에 반응을 나타낼 경우 수정이 정상적으로 이루어지지 않는다. 따라서 수정능 획득과 침체반응이 일어난 정자는 정상적인 수정을 할 수 없기 때문에 이들의 증가는 정액의 질적인 저하를 나타낸다고 볼 수 있다.

이상의 결과를 종합하면, 정액내 세균수는 3일차부터 유의적($p<0.01$)으로 증가하였으며, pattern F(수정능 획득 및 침체반응이 일어나지 않은 정자)의 비율도 3일차부터 유의적($p<0.001$)으로 증가하였다. 다만, 정자의 생존율은 보존 5일째부터 유의적인($p<0.01$) 저하를 나타내어 세균에 대한 정자의 반응은 우선적으로 침체에 나타나고, 차후 생존율에 반응을 나타나는 것으로 사료된다. 따라서 항생제를 첨가하지 않은 정액은 보존 3일째부터 세균의 영향을 받기 때문에 세균에 오염되지 않은 정액을 채취하거나 세균이 오염되었다고 판단되는 정액은 최대한 빠른 기간 이내에 정액을 사용하여야 한다고 사료된다.

인용문헌

- Althouse GC (1999): Origenes y efectos de la contaminación microbiológica en el semen porcino conservado. In: Proceedings of the VI symposium on Int de Reprod E I.A. Porcina. pp.7-13.
- 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 [abstract].
- Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM (2000): Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 53:1167-1176.
- Althouse GC, Lu KG(2005): Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63:573-84.
- Austin C(1951): Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Biol Sci* 4: 581-596.
- Britt JH, Almond GW, Flowers WL (1999): Diseases of the reproductive system. In: Strae B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D (eds), *Disease of Swine*, 8th edn. Blackwell Science Ltd, Ames, IA, p. 905.
- Dahlberg B (1990): Asthenozoospermia/teratozoospermia and infertility. *Arch Androl* 25:85-87.
- Dubéa C, Martin B, Carlos R, Christine G, Janice LB (2004): Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* 62:874-886.
- > Foxcroft GR, Dyck MK, Ruiz-Sanchez A, Novak S, Dixon WT (2008): Identifying useable semen. *Theriogenology* 70:1324-1336.
- Gadea J, Matas C (2000): Sperm factors related to *in vitro* penetration of porcine oocytes. *Theriogenology* 54:1343-1357.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM (2000): Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 18:143-172.
- Jung LA, Park MH, Park BS, Kim HY, Byun JW, Jeon AB, Chung KH, So KM, Jung BR (2011): Prevalence of bacteria contaminated in boar semen. *Korean Journal of Veterinary Science* 51: suppl. p 60.
- Kim IC, Sa SJ, Kang K, Kim SH, Bae SJ, Kim DS, Kim SJ, Min CS, Son JH, Chung KH (2011): Current status of swine artificial insemination(AI) in Korea. *Reproductive & Developmental Biology* 35: 227-232.
- Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruif A, Van Soom A (2008): Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology* 70:1337-1345.
- Maroto Martín LO, Muñoz EC, De Cupere F, Van Driessche E, Echemendia-Blanco D, Rodríguez JM, Beekmans S (2010): Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Anim Reprod Sci* 120:95-104.
- Sa SJ, Kim MJ, Cho KH, Kim DW, So KM, Chung KH, Son JH, Kim IC (2011): Effect of storage in different commercial semen extender on the motility, viability and fertility *in vitro* of boar spermatozoa. *Reproductive & Developmental Biology* 35:203-208.
- Sone M (1982): Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. *Vet Rec* 111:11-14.
- 이현택 (2007): 돼지 액상정액의 보존일수에 따른 세균 오염도 및 정액성장 변화. *진주산업대학교 농학석사 학위논문* p 20.
(접수일자: 2012. 8. 16 / 채택일자: 2012. 9. 20)