

<원 저>

정상 한우 및 번식장애 한우에 대한 자궁 내 세균 분석

김기주¹ · 박소연¹ · 조영재¹ · 정배동¹ · 박정준² · 한태욱^{1,*}

¹강원대학교 수의과대학 및 동물의학종합연구소, ²동물발생공학연구소

(접수: 2014년 7월 4일, 수정: 2014년 10월 15일, 게재승인: 2014년 10월 21일)

Characteristic of bacterial flora from the uterus in HanWoo cattle

Kijoo Kim¹, Soyeon Park¹, Youngjae Cho¹, Bae-Dong Jung¹, Joung-Jun Park², Tae-Wook Hahn^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Animal Reproduction and Biotechnology Center, Hoengseong 225-807, Korea

(Received: July 4, 2014; Revised: October 15, 2014; Accepted: October 21, 2014)

Abstract : Uterine sterilization is important for improving fertility in cattle. This study compared bacterial flora in the uterus between healthy and repeat breeder cows (RBCs). The uterine flushing of six heifers, 13 healthy HanWoo cows and eight RBCs (HanWoo) were sampled, and 15 frozen semen samples were selected. Overall, 35 bacteria were identified from in HanWoo uterine flushing and semen. The bacterial genera identified from HanWoo uterine flushing were *Alloiococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Gardnerella*, *Granulicatella*, *Kocuria*, *Pantoea*, *Pasteurella*, *Rothia*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* and *Streptococcus*. The bacterial genera identified from HanWoo semen were *Bacillus*, *Escherichia*, *Kocuria*, *Oligella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* and *Streptococcus*. The prevalence and presence of the identified bacteria between healthy cows and RBCs differed significantly. Further studies are needed to determine the role of these bacteria in the uterus of HanWoo cattle with reproductive disorder.

Keywords : bacterial flora, HanWoo, repeat breeder, semen, uterus

서 론

국민 1인당 쇠고기의 소비량은 미국의 경우 연간 약 44 kg이며 [21], 2011년 한국농촌경제연구원에서 보고한 쇠고기 수급 전망에 따르면 국내 한우 고기의 소비량은 약 10.7 kg으로 해마다 증가하여 2017년에는 12 kg을 넘어설 것으로 예측하고 있다. 이에 따라 국내에서는 번식우를 사육하는 농가의 형태가 점점 대규모화하는 추세이다. 하지만 번식 장애우의 발생 빈도가 상승함으로 인해 지난 25년간 전 세계적으로 번식우의 출산율은 60%에서 30~40%로 감소하였다 [19]. 특히 난소를 포함한 생식기관에 특별한 임상 증상이 없음에도 불구하고 인공수정 시 3회 이상 수태되지 않는 저수태우(repeat breeder cow)는 번식장애 발생 유형 중 가장 큰 비중을 차지하고 있으며, 그 비율은 젖소의 경우 10~20%, 육우에서는 20% 전후, 한우에서는 10.8~16.2%로 보고된 바

있다 [2]. 전 세계적으로 번식우 사육 농가의 저수태우 발생 비율이 증가함에 따라 정액과 인공수정 비용의 손실, 수태 간격의 증가, 수태효율 저하, 진료와 치료 비용 발생, 도태와 대체 비용의 증가 등으로 인한 경제적인 부담이 상당하다 [5, 12, 17].

저수태우의 원인으로는 초기 배아의 사멸, 배란 이상, 자궁내막의 손상, 스트레스, 호르몬 분비의 이상 등 매우 다양하지만 [15, 22, 23], 특히 세균에 의한 자궁 내 감염은 다양한 질병을 일으킬 수 있고 생식기관 내 환경을 변화시켜 수태율을 저하하는 원인이 되기 때문에 매우 중요하게 인식되고 있다. 특히 출산 전 자궁 내강은 무균상태여야 하지만 다양한 미생물이 검출되고 있으며, 생식기 감염으로 인해 시상하부, 뇌하수체 그리고 난소에 영향을 미쳐 수태에 필요한 호르몬 불균형을 초래하며, 수태되어도 태아의 재흡수 또는 유산 등을 일으킬 수 있다 [24].

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-8671, Fax: +82-33-259-5625

E-mail: twahn@kangwon.ac.kr

최근에는 저장 기술이 발달함으로 인해 장기간 동안 난자 및 정자를 보존할 수 있어 이로운 점이 많지만, 인공수정에 의한 번식형태가 증가함에 따라 세균에 오염된 생식세포의 보급은 매우 위험할 수 있다 [3, 29]. 특히 상업화된 인공수정용 정액으로부터 *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus(S.) sciuri* 등을 비롯하여 다양한 세균이 발견되고 있으며 [8, 27], 이 같은 세균들에 의한 자궁 내 감염은 정자의 운동성과 배아의 발달에 심각한 영향을 줄 수 있다 [9]. 게다가 병원성 세균에 의한 자궁 내 감염은 염증 또는 면역 반응의 유도도 인해 수태에 필요한 사이토카인 또는 호르몬에 나쁜 영향을 초래할 수 있다.

이처럼 미생물에 의한 생식기 감염은 다양한 질병을 유발하여 수태율을 떨어뜨리기 때문에 매우 중요하게 인식되고 있음에도 불구하고, 한우를 대상으로 한 연구는 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 사육되고 있는 한우를 대상으로 자궁 내 세균총을 조사하였으며, 또한 인공수정용 정액을 대상으로 균 분리 및 동정을 통해 발견된 세균들의 분포를 조사하였다.

재료 및 방법

시료의 채취

강원도에 위치한 두 개의 한우 사육농가를 대상으로 미발정주기 암소를 선택하여 정상번식 경산우 13두와 번식장애

경산우 8두 그리고 대조군으로 미경산우 6두의 자궁 세척액을 각각 채취하였다. 또한 실험에 사용된 동결정액은 시중에서 판매되고 있는 한우 인공수정용 정액을 무작위로 15개 선택하여 액체질소 탱크에 보관한 후 실험에 사용하였다. 자궁 세척액을 채취하기 위해 고압 멸균된 생리식염수를 40 mL씩 준비하였으며, 세척액의 자궁 내 삽입과 회수를 위하여 Foley balloon catheter(Rüsch, Germany)를 사용하였다. 철심이 연결된 catheter는 sheath(IMV Technologies, France)로 보호한 상태로 한우의 자궁경을 통과시켜 자궁각 부근까지 삽입하여 고정한 후, 철심을 제거하였다. 자궁 세척액을 회수하기 위해 60 mL 관류용 주사기(Hwajin, Korea)로 생리식염수를 40 mL씩 담아 자궁 내로 관류액을 유입시키고, 다시 회수하는 순환관류법을 사용하여 개체별로 자궁 세척액을 회수하였다. 회수방법은 주사기와 catheter를 연결한 후, 주사기 내의 생리식염수를 직접 자궁 내로 주입하고, 다시 흡입시켜 개체에 따라 1회 또는 2회 반복 채취하였다. 회수된 자궁 세척액은 Falcon 50 mL conical tube(Becton, Dickinson and Company, USA)에 담아 저온상태로 실험실로 운반하여 분석에 사용하였다.

한우 자궁 세척액과 정액 내 세균의 분리 및 동정

한우의 자궁 세척액과 동결정액을 멸균된 micro centrifuge tube에 100 µL씩 분주한 후 생리식염수를 900 µL 첨가하여 1 : 10으로 희석하였으며, 음성대조군으로는 생리식염수를 분

Table 1. Identification of bacteria isolated from normal HanWoo uterus flushing

Number	Bacteria (number of identified bacteria)	Month old	Calving number
1	<i>Granulicatella elegans</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> (2)	119	8
2	-	122	8
3	-	92	6
4	Nd	95	6
5	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> (2)	63	4
6	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (1)	49	3
7	<i>Bacillus lentus</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>coli</i> (3)	50	2
8	-	37	2
9	-	39	2
10	<i>Pantoea</i> subsp. (1)	39	2
11	-	30	1
12	<i>Bacillus lentus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> (4)	29	1
13	<i>Staphylococcus lentus</i> (1)	27	1
14	<i>Staphylococcus lentus</i> (1)	16	0
15	<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> (2)	15	0
16	<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Staphylococcus vitulinus</i> (3)	14	0
17	<i>Bacillus pumilus</i> (1)	16	0
18	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Kocuria rosea</i> , <i>Staphylococcus vitulinus</i> (5)	15	0
19	<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> (4)	15	0

Nd, not detected; -, not identified by VITEK II.

주하였다. 각 시료는 Difco MacConkey agar(Becton, Dickinson and Company)와 Difco blood agar(Becton, Dickinson and Company)에 100 μ L씩 도말하였다. 5% CO₂ 일반 호기성 조건과 통성 혐기성 조건(BBL GasPak Systems; Becton, Dickinson and Company)으로 37°C에서 48~72시간 배양한 후 관찰된 집락을 모양과 색깔별로 분류하였다. 분리된 단일 집락은 새로운 Difco blood agar(Becton, Dickinson and Company)에 각각 접종하여 동일한 조건으로 배양한 뒤 Gram 염색을 통해 그람양성균과 그람음성균으로 분류하였으며, VITEK II system(BioMérieux, USA)을 이용하여 균을 동정하였다.

결 과

미경산 한우의 자궁 내 세균 분석

미경산 한우의 자궁 내 세균총을 조사하기 위해 6개체의 자궁 세척액에서 분리된 균을 분석한 결과 모든 개체에서 1

개 이상의 균이 검출되었다(Table 1). 검출된 균은 10종으로 *S. lentus*, *Bacillus(B.) pumilus*, *Serratia plymuthica*, *S. vitulinus*, *B. licheniformis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Kocuria (K.) rosea*, *Sphingomonas paucimobilis*, *S. sciuri* 그리고 *S. xylosoxus*로 나타났다. 그중 *B. pumilus*는 5개체에서 발견되어 83.3%의 매우 높은 수준의 검출률을 나타냈으며, *S. lentus*와 *S. vitulinus*는 각각 2개체에서 발견되어 33.3%의 검출률을 보였다.

정상번식 한우의 자궁 내 세균 분석

정상번식 한우의 자궁 내 세균총을 조사하기 위해 13개체의 자궁 세척액에서 분리된 균을 분석한 결과 7개체에서 균이 검출되었으며, 1개체에서는 균이 검출되지 않았고, 5개체에서는 균이 분리되었지만 VITEK II system(bioMerieux)으로 동정되지 않았다(Table 1). 검출된 균은 9종으로 *Granulicatella(G.) elegans*, *S. lentus*, *Enterococcus(E.) casseliflavus*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *B. lentus*, *Sphingomonas*

Table 2. Identification of bacteria isolated from repeat breeder cow uterus flushing

Number	Bacteria (number of identified bacteria)	Month old	Calving number.
1	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , <i>Rothia mucilaginosa</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (5)	96	6
2	Nd	59	2
3	<i>Streptococcus alactolyticus</i> , <i>Granulicatella adiacens</i> (2)	51	2
4	<i>Alloiococcus otitis</i> , <i>Streptococcus alactolyticus</i> (2)	45	2
5	<i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Kocuria rosea</i> , <i>Granulicatella adiacens</i> (3)	47	2
6	<i>Granulicatella adiacens</i> (1)	42	2
7	<i>Kocuria rosea</i> , <i>Streptococcus alactolyticus</i> (2)	49	2
8	<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Granulicatella adiacens</i> , <i>Kocuria rosea</i> , <i>Pasteurella canis</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (5)	62	2

Table 3. Identification of bacteria isolated from HanWoo semen

Number	Bacteria (number of identified bacteria)
1	Nd
2	<i>Kocuria kristinae</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (2)
3	-
4	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (1)
5	<i>Kocuria kristinae</i> (1)
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Streptococcus uberis</i> (4)
7	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> (1)
8	Nd
9	<i>Streptococcus uberis</i> (1)
10	-
11	-
12	Nd
13	<i>Escherichia coli</i> , <i>Oligella ureolytica</i> , <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> , <i>Streptococcus uberis</i> (4)
14	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2)
15	<i>Bacillus sporothermodurans</i> , <i>Kocuria varians</i> (2)

paucimobilis, *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*, *Pantoea* subsp. 그리고 *B. pumilus*로 나타났다. 그중 *S. lentus*는 4개체에서 발견되어 30.7%의 검출율을 나타냈으며, *E. casseliflavus*는 2개체에서 발견되어 15.3%의 검출률을 보였다.

번식장애 한우의 자궁 내 세균 분석

번식장애 한우의 자궁 내 세균총을 조사하기 위해 8개체의 자궁 세척액에서 분리된 균을 분석한 결과 1개체를 제외한 나머지 7개체에서 1개 이상의 균이 검출되었다(Table 2). 검출된 균은 12종으로 *Enterobacter aerogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Rothia mucilaginosa*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus alactolyticus*, *G. adiacens*, *Alloiococcus otitis*, *S. chromogenes*, *K. rosea*, *Gardnerella vaginalis* 그리고 *Pasteurella canis*로 나타났다. 그 중 *G. adiacens*는 4개체에서 발견되어 50%의 높은 수준의 검출률을 나타냈으며, *Streptococcus alactolyticus*와 *K. rosea*는 3개체에서 발견되어 37.5%, *Sphingomonas paucimobilis*는 2개체에서 발견되어 25%의 검출률을 보였다.

한우 정액 내 세균 분석

한우 정액 내 세균의 분포를 조사하기 위해 15개의 인공수정용 정액에서 분리된 균을 분석한 결과 9개의 시료에서 균이 검출되었으며, 3개의 시료에서는 균이 검출되지 않았고, 나머지 3개의 시료에서는 균이 분리되었지만 VITEK II system(bioMerieux)으로 동정되지 않았다(Table 3). 검출된 균은 13종으로 *K. kristinae*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus uberis*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *Escherichia coli*, *Oligella ureolytica*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *B. sporothermodurans* 그리고 *K. varians*로 나타났다. 그중 *Sphingomonas paucimobilis*와 *Streptococcus uberis*는 3개의 시료에서 관찰되어 20%의 검출률을 보였다.

고 찰

출산 후 한우의 자궁 내 세균에 의한 오염은 매우 흔하게 나타날 수 있고, 세균의 감염으로 인해 다양한 임상 질병을 일으켜 시상하부 또는 뇌하수체를 비롯한 난소와 자궁에 직접적인 영향을 미칠 수 있으며, 질병의 치료 후에도 지속해서 재발할 수 있다 [24]. 출산 후 2주 이내에 자궁 내 세균의 감염률은 80~100%로 매우 높은 수준이며, 체내의 면역 반응에도 불구하고 출산 3주 후 감염률은 40%로 여전히 높게 나타난다고 보고된 바 있다 [26]. 이처럼 병원성 세균에 의해 발생할 수 있는 번식장애를 예방하기 위해 효과적인 진단과 치료가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 정상번식 한우와 번식장애 한우의 자궁 세척액, 인공수정용 정액을 대상으로 분리 동정된 세균에 대한 특성을 조사하였다. 자궁 세척액에 대한 균 검출률은 미경산우 100%, 정상번식 한우

53.8%, 저수태우 87.5% 그리고 인공수정용 정액에서는 60%를 나타냈으며, VITEK II system에 의해 동정이 되지 않은 세균을 포함하면 더 높을 것으로 생각된다. 동정된 세균의 종류는 총 35종으로 자궁 세척액에서 24종, 정액에서 13종을 나타냈으며, 그중 2종(*Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*)이 자궁 세척액과 정액에서 중복으로 관찰되었다. 최근에 보고된 미발정주기 암소의 자궁 내 세균 분석과 비교해보면 미경산 한우의 자궁 내에서 4종(*Sphingomonas paucimobilis*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*)이, 동결정액에서는 1종(*Sphingomonas paucimobilis*)이 동일하게 나타났다 [20].

본 연구에서 분리 동정된 세균의 특성은 일반적으로 토양이나 물과 같은 환경상태에 널리 분포된 균으로 대부분 건강한 동물이나 사람에게 심각한 질병을 일으키지는 않지만 면역력이 저하된 숙주에게는 기회감염을 통해 질병을 일으키기도 한다. 미경산 한우의 자궁에서 가장 높은 빈도로 분리된 *B. pumilus*는 식물의 성장에 있어 중요한 역할을 하는 토양균으로 보통 임상적으로는 병원성을 나타내지 않는다 [7, 16]. 정상번식 한우에서 가장 많이 분리된 *S. lentus*는 가축의 피부나 점막 표면에 서식하는 균으로 한국의 발효음식인 된장에서 주로 발견되며 일반적으로는 병원성이 없다 [18]. 다음으로 높게 분리된 *E. casseliflavus*는 사람과 동물의 장내에서 주로 발견되며, 국내 야생 거위의 분변 시료에서 20% 이상 검출되었다고 보고된 바 있지만 일반적으로 비병원성 세균으로 알려졌다 [14]. 반면에 번식장애 한우의 자궁 세척액에서 가장 많이 분리된 *G. adiacens*는 nutritionally variant streptococci(NVS)로 불리기도 하며, 사람에게 감염성 심장 내막염을 일으켜 높은 치사율을 나타낸다 [13]. 다음으로 많이 분리된 *K. rosea*는 비병원성 세균으로 인식되고 있지만 기회감염을 통해 최근 하행 괴사성 중격동염의 발병 사례가 있으며, *Streptococcus alactolyticus*는 드물게 신생아에게 respiratory distress syndrome(RDS)를 일으키는 사례가 발생하고 있다 [28]. 또한 *Alloiococcus otitis*는 중이염에 걸린 환자에서 높은 빈도로 검출되고 있으며, 특히 어린이에게서 발생하는 이염과 밀접한 연관이 있다는 연구가 보고되고 있으며 [1], *Sphingomonas paucimobilis*는 가축에 대한 병원성은 아직 알려진 것이 없고 면역력이 약화된 아이들에게 드물게 감염되기도 하지만 심각한 증상을 일으키지 않는다 [6]. 한편, *Erysipelothrix rhusiopathiae*는 동물에게 병원성을 일으키는 균주로 드물게 어린 암소에서 치사율이 높은 급성 심장 내막염을 일으키기도 한다 [11]. 또한 인공수정용 정액에서 가장 많이 발견된 *Streptococcus uberis*는 소에서 유방염을 일으키는 병원성 균주로 감염되면 심각한 균혈증 또는 폐혈증을 동반한다고 보고된 바 있다 [10].

이와 같이 한우의 자궁 및 정액 내에는 무균상태이어야 함에도 많은 개체에서 다양한 균이 검출되었다. 게다가 미경산 한우, 정상 한우 그리고 번식장애 한우의 자궁 세척액과 인공수정용 정액 내 세균의 분포는 서로 다른 양상을 나타냈다. 특히 번식장애 한우의 자궁 세척액에서 발견된 다수의

병원성 세균은 수태에 필요한 자궁 내 환경에 상당한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 예를 들어 생식기를 통해 *Escherichia coli*와 같은 병원성 세균에 감염되는 경우, 자궁의 방어기전에 관여하는 다형핵 호중구(Polymorphonuclear neutrophils, PMNs)가 자궁 내로 유입되어 면역 반응으로 염증이 발생하면 사이토카인이 분비되고 정상적인 임신 관련 호르몬의 합성을 방해하여 수태율을 떨어뜨리는 원인이 되기 때문에 자궁 내 미생물 환경을 조절하는 것이 중요하다 [4, 25].

결론적으로 한우의 자궁과 정액 내에서 분리 동정된 다수의 미생물은 대부분 비병원성으로 크게 문제가 되지 않는 세균이지만, 번식장에 한우의 개체에서는 치명적인 증상을 일으킬 수 있는 병원성 세균이 분리되었다. 앞으로도 지속적인 연구를 통해 정상번식 한우와 번식장에 한우의 자궁 내 세균총이 확립된다면 저수태우의 원인을 밝히는 데 도움이 될 것으로 생각한다. 또한 본 연구에서 분리된 세균총을 대상으로 항생제 감수성 또는 항균효과에 대해 시험을 해볼 필요도 있다고 본다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업(Grant No. 112130-3)에 의해 이루어진 것이며, 강원대학교 동물의학종합연구소의 기술지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

1. Arar S, Vinogradov E, Shewmaker PL, Monteiro MA. A polysaccharide of *Alloiococcus otitidis*, a new pathogen of otitis media: chemical structure and synthesis of a neoglycoconjugate thereof. *Carbohydr Res* 2008, **343**, 1079-1090.
2. Baek KS, Seong HH, Ko YG, Lee Ms, Ryu IS, Kang HS, Cho WM, Shin KJ. Studies on the incidence of reproductive disorder in Hanwoo. *Korean J Animal Reprod* 1997, **21**, 411-421.
3. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 2000, **21**, 1-7.
4. Barański W, Łukasik K, Skarzyński D, Sztachńska M, Zduńczyk S, Janowski T. Secretion of prostaglandins and leukotrienes by endometrial cells in cows with subclinical and clinical endometritis. *Theriogenology* 2013, **80**, 766-772.
5. Bartlett PC, Kirk JH, Mather EC. Repeated insemination in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Theriogenology* 1986, **26**, 309-322.
6. Bayram N, Devrim I, Apa H, Gülfidan G, Türkyılmaz HN, Günay I. *Spingomonas paucimobilis* infections in children: 24 case reports. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013, **5**, e2013040.
7. Bentur HN, Dalzell AM, Riordan FA. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007, **6**, 12.
8. Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003, **46**, 146-152.
9. Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod* 2009, **24**, 2457-2467.
10. Czabańska A, Holst O, Duda KA. Chemical structures of the secondary cell wall polymers (SCWPs) isolated from bovine mastitis *Streptococcus uberis*. *Carbohydr Res* 2013, **377**, 58-62.
11. Edwards GT, Schock A, Smith L. Endocarditis in a British heifer due to *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. *Vet Rec* 2009, **165**, 28-29.
12. García-Ispuerto I, López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C, López-Béjar M. Factors affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain. *Theriogenology* 2007, **67**, 632-638.
13. Garibyan V, Shaw D. Bivalvular endocarditis due to *Granulicatella adiacens*. *Am J Case Rep* 2013, **14**, 435-438.
14. Han D, Unno T, Jang J, Lim K, Lee SN, Ko G, Sadowsky MJ, Hur HG. The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea. *Int J Food Microbiol* 2011, **144**, 387-392.
15. Kendall NR, Flint AP, Mann GE. Incidence and treatment of inadequate postovulatory progesterone concentrations in repeat breeder cows. *Vet J* 2009, **181**, 158-162.
16. Logan NA. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol* 2012, **112**, 417-429.
17. Moss N, Lean IJ, Reid SW, Hodgson DR. Risk factors for repeat-breeder syndrome in New South Wales dairy cows. *Prev Vet Med* 2002, **54**, 91-103.
18. Nam YD, Chung WH, Seo MJ, Lim SI, Yi SH. Genome sequence of *Staphylococcus lentus* F1142, a strain isolated from Korean soybean paste. *J Bacteriol* 2012, **194**, 5987.
19. Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 2000, **53**, 841-857.
20. Park JJ, Yoo HJ, Cho YJ, Choi HW, Yoon PS, Lee SG, Jung BD, Hahn TW. Analysis of uterine bacteria to increase reproductive efficiency in Hanwoo (Korean Native Cattle). *J Embryo Transf* 2013, **28**, 49-55.
21. Pimentel D, Pimentel M. Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *Am J Clin Nutr* 2003, **78** (Suppl), 660S-663S.
22. Rizzo A, Minoia G, Trisolini C, Manca R, Sciorsci RL. Concentrations of free radicals and beta-endorphins in repeat breeder cows. *Anim Reprod Sci* 2007, **100**, 257-263.
23. Salasel B, Mokhtari A, Taktaz T. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology* 2010, **74**, 1271-1278.
24. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 2004, **82-83**, 295-306.
25. Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Domest Anim* 2009, **44** (Suppl 3), 1-9.
26. Sheldon IM, Williams EJ, Miller AN, Nash DM, Herath S.

- Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J* 2008, **176**, 115-121.
27. **Thibier M, Guerin B.** Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000, **62**, 233-251.
28. **Toepfner N, Shetty S, Kunze M, Orlowska-Volk M, Krüger M, Berner R, Hentschel R.** Fulminant neonatal sepsis due to *Streptococcus alactolyticus* - a case report and review. *APMIS* 2014, **122**, 654-656.
29. **Zampieri D, Santos VG, Braga PAC, Ferreira CR, Ballottin D, Tasic L, Basso AC, Sanches BV, Pontes JHF, da Silva BP, Garboggini FF, Eberlin MN, Tata A.** Microorganisms in cryopreserved semen and culture media used in the *in vitro* production (IVP) of bovine embryos identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Theriogenology* 2013, **80**, 337-345.