

## 소 체외수정란 생산에 있어 미생물 제어에 관한 연구

이명식 · 고응규 · 임기순 · 장원경 · 양보석 · 오성종 · 박용운

축산기술연구소

### Studies on the Microbe Control at Bovine Embryo Production by *In Vitro* Fertilization

Lee, M. S., Y. G. Ko, G. S. Im, W. K. Chang, B. S. Yang, S. J. Oh and Y. Y. Park

National Livestock Research Institute

#### SUMMARY

These studies were conducted to investigate the microbe control effect of antibiotics treatment in all media used for *in vitro* fertilization(IVF) embryo production. The bovine oocytes were recovered from follicles(2~5mm) and were cultured for 22hrs at 38.5°C with 5% CO<sub>2</sub> incubator. The contamination and development rate *in vitro* fertilized oocyte was evaluated everyday.

The results were summerized as follow:

1. Control, antibiotic-antimycotic solution(AAS, Gibco) 1% + gentamycin, and AAS 1% + kanamycin(Sigma, USA) treatment was contaminated within 72hrs. However Baytril and Kanamycin(Korea) added was not contaminated.
2. The blastocyst formation rate in Baytril supplemented 1, 2 and 3  $\mu$ l /ml was 3.73, 1.28 and 0.00%, respectively.
3. The blastocyst formation in kanamycin added concentration of 50, 75 and 100 $\mu$ g /ml was 13.0, 9.4 and 3.49%, respectively.

(Key words : bovine *in vitro* fertilization, contamination, blastocyst)

#### I. 서 론

여러 가지 호기적, 혐기적 박테리아뿐만 아니라, 생식기관내의 mycoplasma가 체외수정시 정액 내에 존재하여 수정란을 오염시킴으로 수정란의 발달에 악영향을 끼친다. 일반적으로, *Bacillus* spp., *Coliforms*, *Corynebacteria* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. 그리고 다수의 곰팡이, 효모균들에 산재하는 유기물들이 외부생식기의 표피와 채취장소 및 실험실 환경이 일반적인 오염원이 된다(Cembrowicz 등, 1961; Foote 등, 1976; Hafs, 1978).

암말의 경우에도 생식기 오염이 종부에 의한 수말의 정액과 생식기내 유기체에 의해 발생되고, 이러한 유기체들은 대부분의 정액에서 발견되고(Bowen 등, 1982; Burns 등, 1975), 한편 Blanchard 등(1987)에 의하면 정액내 미생물의 조절은 적당한 농도의 항생제를 포함하고 있는 희석정액의 사용이 효과적이다. Wong 등(1986)은 사람정액내 microbes를 제거하기 위하여 정액 washing과 swim up기술을 사용했을 때 정자 농도를 감소시키며, 정액내 미생물의 수를 상당히 감소시킨다. 또한 Ham F-10 배양액내 penicillin과 streptomycin첨가는 일부 microbes에 작용하여 증식을 억제하며 bacterival수를 감소시킨다.

체외수정란 생산을 위해 정액 washing액가 수정용

medium에 적당량의 항생제 첨가는 배발달에 효과적이다. 따라서 본 연구는 미생물 조절을 위해서 여러 가지 항생제의 적정첨가 수준이 체외수정란 발달에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 검토해 보고자 실시하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 체외성숙

본 실험에 공시된 난포란은 도축장에서 도살된 암소에서 절취한 깨끗한 난소를 채취하여 1l의 0.9% 생리식염수에 penicillin 100,000IU와 streptomycin 100 mg을 첨가하고 2~3회 깨끗이 씻어 30℃의 온도를 유지하여 항온 실험실로 운반하였다. 체란은 직경 2~5mm의 난포로부터 18gauge needle로 흡입 채란하여 실험현미경 하에서 cumulus cell이 고르게 충실히 부착된 난포란을 선별하여 CO<sub>2</sub> 5%, 38.5℃ 온도의 배양기에서 22시간 동안 배양하여 체외성숙시켰다.

### 2. 정자처리

한우의 동결정액을 37℃ water bath에서 10~15초 동안 용해하여 사용하였으며, 기본배양액으로 Brakett와 Oliphant(1975)의 BO액을 사용하였고 정자세척용 BO액에는 BSA(Gibco, A-9418)를 포함시키지 않고 실험목적에 따라 항생제를 첨가하였고, 수정용 BO액에는 BSA 5mg/ml, heparin(Sigma) 10μg/ml, caffeine 2.5mM, 그리고 항생제를 첨가하였다. 한편 최종정자 농도는 1~2×10<sup>6</sup>cell/ml로 조정하였다.

### 3. 체외수정

수정능 획득을 유기하기 위하여 동결정액을 용해한 후 conical tube(Sigma, C8046)에 넣어 세척용 BO액을 5배 희석하여 1,800rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 이 과정을 3회 반복한 후 1~2×10<sup>6</sup>/ml이 정자수가 되도록 수정용 BO액을 넣어 조정한다. 그리고 22시간 체외성숙시킨 난포란을 수정용 BO액에서 5회 세척한 후 35mm petri dish(falcon, 35×10mm)에 100μl drop를 만든 다음 10~20개 난포란을 주입시켜 6시간 동안 수정시켰다.

### 4. 체외수정란의 배양

체외성숙 난포란을 6시간 동안 체외수정 시킨 후 TCM 199(Gibco, USA) medium에서 3회 세척 후 발생배양액으로 옮긴다. 이 배양액은 수정전 난포란을 성숙시켰던 cumulus cell의 monolayer가 형성된 drop에 수정란을 옮겨 온도 38.5℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 공배양시켰다.

배양액은 48시간마다 신선배양액으로 교체하고, 공배양 세포가 수정란을 배양접시 바닥에 부착시키는 것을 방지하기 위하여 24시간마다 배양접시 주변을 가볍게 쳐주어 분리시켰다. 그리고 24시간마다 수정란의 오염상태를 조사하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 정자처리 배양액에 첨가된 항생제 효과

수정란의 오염을 방지하기 위하여 정액 washing액과 체외수정용 medium에 여러 가지 항생제를 첨가하여 나타난 수정란의 배양시간별 오염상태는 Table 1과 같다. Antibiotic-antimycotic solution(Sigma, 이하 AAS) 1%를 첨가한 대조구에서는 배양 28, 48 시간내에 모두 오염이 되었고 AAS 1% + gentamycin(Sigma) 1μl/ml첨가구에서는 3반복 중 48시간과 72시간 배양에서 오염이 나타났다. AAS 1% + kanamycin 2μl/ml처리구에서는 3처리구 중 한 처리구가 72시간 배양시 오염이 되어 부분적으로 미생물 제거가 가능했다. 그러나 baytril 25INJ(Korea) 1μl/ml처리구와 kanamycin(Korea) 50μg/ml처리구에서는 양쪽 다 전혀 오염이 발생되지 않았다.

일반적으로 gentamycin sulfate 100μg/ml 이상을 정액 희석시 희석액에 첨가할 경우 Jasko 등(1993)은 정자활력을 떨어뜨리기에 동결정액 제조시에도 사용을 피하는 것이 바람직하다고 보고하였다. 마찬가지로 이러한 gentamycin sulfate를 정액 washing액 및 체외수정용 medium에 과량 첨가되었을 때 수정란의 발생에 더욱 심각한 악영향을 끼치리라고 사료된다.

한편 Mochizuki 등(1991)은 소 체외수정시 배양액에 kanamycin을 첨가하여 사용하였고 오염문제가 발생되지 않았다.

**Table 1. Effects of antibiotics added to bovine sperm washing and *in vitro* fertilization medium**

Used antibiotics	Replication	The times of contamination			
		<24 hours	<48 hours	<72 hours	<96 hours
Control (AAS 1%)	I	Contaminated			
	II	-	Contaminated		
	III	Contaminated			
AAS 1% + gentamycin(Sigma) 1 $\mu$ l/ml	I	-	Contaminated		
	II	-	-	-	-
	III	-	-	Contaminated	
AAS 1% + kanamycin(Sigma) 2 $\mu$ l/ml	I	-	-	-	-
	II	-	-	-	-
	III	-	-	Contaminated	
Baytril 25INJ (Korea) 1 $\mu$ l/ml	I	-	-	-	-
	II	-	-	-	-
	III	-	-	-	-
Kanamycin (Korean) 50 $\mu$ g/ml	I	-	-	-	-
	II	-	-	-	-
	III	-	-	-	-

- : No evidence of contamination

**Table 2. The detrimental effect of baytril on Bovine embryo production by *in vitro* fertilization**

Concentration of baytril( $\mu$ l/ml)	No. of oocytes inseminated	No. and(%) of embryos developed to			
		> 2-cell	> 8-cell	Morula	Blastocyst
1	214	53(24.7)	32(14.9)	14(6.54)	8(3.73)
2	233	21( 9.01)	12( 5.15)	6(2.57)	3(1.28)
3	207	13( 6.2)	8( 3.86)	-	-

Baytril contain enrofloxacin 25mg/ml

## 2. Baytril 첨가가 배 발달에 미치는 영향

Table 1에서와 같이 baytril첨가시 수정란의 오염이 나타나지 않았으며 baytril의 첨가수준에 따라 배 발달 결과는 Table 2와 같다. Baytril농도를 1ml당 1, 2, 3 $\mu$ 로 첨가하여 체외수정란의 배반포 발생의 결과를 보면 각각 8/214(3.73%), 3/233(1.28%), 0/207(0.00%)로 1 $\mu$ l/ml첨가시 배발달률이 가장 좋았으나 Takagi 등(1992)이 소 체외수정란 생산율 18%로 보고한 성적보다 상당히 낮은 결과를 보였는데, 이는 baytril에 의한 독성 영향이 상당히 크게 작용된 것으로 사료된다.

## 3. Kanamycin 첨가수준에 따른 배 발달율

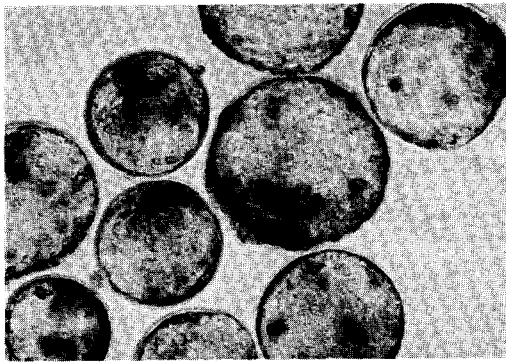
Table 1에서 언급한 바와 같이 kanamycin(Korea) 첨가시에 또한 배 발달 과정에서 오염이 되지 않았으며 첨가 농도에 따른 배 발달 결과가 Table 3에서와 같이 다르게 나타났다. Kanamycin의 첨가농도를 50, 75, 100 $\mu$ g/ml첨가시 체외수정란의 배반포까지 발달률은 각각 36(13.0%), 24(9.4%), 8(3.49%)로 50 $\mu$ g/ml 첨가시 13%로 가장 좋은 결과를 보였으며 체외 수정 후 7.5일에 수확한 expanding blastocysts는 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

Mochizuki 등(1991)은 TCM-199 medium에 kanamycin을 50 $\mu$ g/ml 첨가하고, granulosa cells수를

**Table 3. Effects of kanamycin added to fertilization medium and developmental ability of bovine embryos**

Concentration of of kanamycin( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	No. of oocytes inseminated	No. and(%) of embryos developed to			
		> 2-cell	> 8-cell	Morula	Blastocyst
50	275	171(62.1)	123(44.9)	76(27.6)	36(13.0)
75	253	88(33.9)	48(18.9)	33(13.0)	24( 9.4)
100	229	43(18.7)	21( 9.17)	12( 5.24)	8( 3.49)

Baytril contain enrofloxacin 25mg /ml



**Fig. 1. Bovine blastocysts harvested on day 7.5.**

0~7.5 $\times 10^6$  /ml 농도로 공배양하여 배반포까지 발달률은 11.3%에서 24.2%까지 보고하였다. 그 외에 Goto 등(1988)은 수정용 medium에 penicillin 100IU/ml와 streptomycin을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  첨가하고, cumulus cell과 공배양하여 배반포 발달율을 15.1%(103/684)로 보고한 성적과 거의 유사하였다.

한편 본 연구에서 kanamycin을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하여 5.24~27.6%의 morula 수정란 생산률을 얻은 결과는 이 등(1993)이 수정용 배양액에 antibiotic-antimycotic solution 1%과 gentamycin(Sigma, USA)을 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$  첨가하여 morula stage 수정란 발달률 40.3%보다 상당히 낮은 결과를 보였는데 이는 사용된 동결정액의 미생물 농도와 종류가 다소 다른 점과 체외수정란 생산시 사용된 공배양 세포의 종류에 따른 영향 및 수정용 배양액에 첨가된 항생제의 독성 영향인 것으로 사료된다.

#### IV. 적 요

본 연구는 한우 체외수정란 생산에 적당한 항생제 선택과 적정 항생제 첨가 수준을 조사하기 위하여, 정액 washing액과 수정용 medium에 각각 다른 항생제 및 첨가농도를 달리하여 배 발달 추이를 검토하고자 실시하였다.

1. AAS 1% + gentamycin 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$  첨가구와 AAS 1% + kanamycin 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$  첨가구에서 48, 72시간에 일부 실험구에서 오염이 나타났지만 baytril 25 INJ 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$  또는 kanamycin (Korea) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리구에서는 전혀 오염이 나타나지 않았다.
2. Baytril농도를 1, 2, 3 $\mu\text{l}/\text{ml}$  처리시 배반포 발달율이 각각 3.73, 1.28, 0.00%로써 미생물 제어효과는 상당히 좋았으나 독성영향으로 수정란 생산이 거의 불가능했다.
3. Kanamycin농도를 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시 배반포 발달율이 각각 13.0, 9.4, 3.49%로 나타났으며 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시 13%의 체외수정란 생산율로써 다소 낮은 배발생율이지만 체외수정시 미생물제어에 가장 효과적이었다.

#### V. 인용문헌

1. Blanchard, T. L., D. D. Vamer, C. C. Love, J. P. Hurtgen, M. R. Cummings and R. M. Kenney. 1987. Use of a semen extender containing antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. Theriogenology, 28:541-546.
2. Bowen, J. M., N. Tobin, R. B. Simpson, W. B. Rey and M. M. Ansari. 1982. Effects of

- washing on the bacterial flora of the bacterial flora of the stallion's penis. J. Reprod. Fert., 32(supple):41-45.
3. Brackett B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
  4. Burns, S. J., R. B. Simpson and J. R. Snell. 1975. Control of microflora in stallion semen with a semen extender. J. Reprod. Fert., 23 (supple):139-142.
  5. Cembrowicz, H. Z. and A. D. Osborne. 1961. The effect of preputial cavity treatment on the number and types of bacteria in semen samples and sheath washings. Proc. 4th International Congress on Animal Reproduction. pp. 468-481.
  6. Foote, R. H. and W. E. Berndtson. 1976. Antibacterial agents for bull semen. Proceedings of the 6th Technical Conference on A. I. and Reprod. pp. 23-30.
  7. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from IVF of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83:753-758.
  8. Hafs. H. D. 1978. Contaminants in semen collection and processing. Proc. 7th N.A.A.B. Tech. Conf. on A. I. and Reproduction. pp. 13-15.
  9. Jasko, D. J., S. J. Bedford, N. L. Cook, E. L. Mumford, E. L. Squires and B. W. Pickett. 1993. Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. Theriogenology, 40:885-893.
  10. Mochizuki, H., Y. Fukui and H. One. 1991. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. Theriogenology, 36(6):973-986.
  11. Peng, C. Wong, Jose P. Balmaceda, Jorge D. Blanco, Ronald S. Gibbs and Ricardo H. Asch. 1986. Sperm washing and swim-up technique using antibiotics removes microbes from human semen. Fert. Steril., 45(1):97-100.
  12. Tagaki, Y., K. Mori, T. Takahashi, S. Sugawara, and J. Masaki. 1992. Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. J. Anim. Sci., 70:1923-1927.
  13. 이명식, 양보석, 정진관, 오성중, 최화식, 박성재, 이근상. 1993. 이식 가능한 체외수정란 생산에 관한 연구. 농업과학논문집. 35(2)513-516.