

저수태 한우 암소 자궁에서 회수된 미생물이 체외수정란 발달율에 미치는 영향

우제석^{1†} · 김기현^{1†} · 조은석^{1†} · 연성흠¹ · 박연배² · 김민규² · 사수진^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²충남대학교 농업생명과학대학

Effect of microorganisms collected from uterus of Hanwoo cattle with low conception rate on the development of IVF-derived embryos

Jae-Seok Woo^{1†}, Ki-Hyun Kim^{1†}, Eun-Seok Cho^{1†}, Seong-Heum Yeon¹, Youn-Bae Park², Min-Kyu Kim², Soo-Jin Sa^{1*}

¹National Institute of Animal Science, Rural Development Administration

²Department of Animal Science and Biotechnology, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

Received on 15 July 2015, revised on 4 September 2015, accepted on 7 September 2015

Abstract : The cause of infertility is either fertilization failure or early embryonic death. The aetiology may involve a combination of many factors, e.g. genetic factors, abnormalities in the gametes nutritional disorders, inadequate luteal function, and delayed ovulation. This study was conducted to investigate the effect of microorganisms collected from uterus of Hanwoo cattle on early embryonic development. Microorganisms isolated from the uterus of Hanwoo cattle included *Bacillus cereus* (Bc), *Bacillus thuringiensis* (Bt), *Staphylococcus warneri* (Sw) and *Enterococcus faecalis* (Ef). When cultured with Bc, Bt, Sw, and Ef, oocytes were not developed into a blastocyst *in vitro*. The proportion of blastocyst was dramatically increased after reducing the number of microorganisms (10^4 CFU/ml). Interestingly, the proportion of blastocyst was decreased by adding the Sw and Ef. These results indicate that among intrauterine microorganisms, Sw and Ef strains negatively affect the early embryonic development, thereby aggravate the rates of implantation and pregnancy. These findings will provide useful information for association studies in other pig populations.

Key words : Cattle, Microorganisms, Early embryonic development, Uterus

I. 서론

국내 한우 사육에 있어 능력 개량과 번식 효율의 증대는 생산성 향상과 경쟁력 있는 사육 기반조성을 위하여 해결해야 할 중요한 과제이다. 이를 위한 효율적 방안중의 하나로 수정란 이식 기술을 이용하고 있다. 수정란 이식은 우수 유전 형질을 보유하고 있는 암가축으로부터 다수의 수정란을 회수하여 다른 개체에 이식 후 자축을 생산함으로써 우수한 유전 형질을 가진 개체를 효과적으로 증식시킬 수 있고, 형질이 동일한 다수의 자축을 단시간 내에 생산이 가능하므로 가축의 능력 개량에 매우 유용하게 이용할 수 있다 (Christensen, 1991). 소 수정란이식의 성공률을 향상시키

기 위하여 수란우의 발정 유무(Nelson and Nelson, 1985), 발정유기 방법(Walton et al., 1986), 자궁각의 위치(Wright, 1981), 이식 부위(Boland et al., 1976), 수란우의 발정동기화(Sreenan, 1983) 및 혈중 progesterone 농도(Sreenan and Diskin, 1987), 영양상태(Broadbent et al., 1991), 산차(Sreenan and Diskin, 1987) 및 황체등급(Donaldson, 1985) 등 많은 연구들이 진행되어져 왔다.

그러나 수정란 이식의 수태율은 매우 저조한 실정이다. 이러한 원인은 다양하지만 그 원인 중의 하나는 자궁 내 미생물의 차이에 있다. 소의 자궁은 분만 후 1 - 2주 동안은 *E. coli*와 같은 Gram-negative 통성 혐기성 균이 자궁 내에 존재하고 분만 후 2주부터는 *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacteroids*, *Fusobacterium*과 같은 Gram-negative 혐기성 균들이 존재하게 된다(Ahlers and Grunert, 1993). 특히 후산정체와 난산은 분만 후 번식 능력에 악영향을 미치

[†]These authors contribute equally to this work.

*Corresponding author: Tel: +82-41-580-3450

E-mail address: soojinsa@korea.kr

고 자궁 감염을 용이하게 한다(Laven and Peters, 1996; Mellado and Reyes, 1994). 그러나 정상적인 자궁은 분만 후 박테리아 침입에 대한 방어기구를 가지고 있는데(Jainudeen et al., 1993), polymorphonuclear inflammatory cells (PMNs)이 질이나 자궁강으로 유입되어 자궁 내부를 감염시키는 미생물들을 탐식함으로써 방어적인 기능을 한다고 알려져 있다(Hussain and Daniel, 1992). 분만 후 경산우나 미경산우가 정상적인 발정 주기를 가지고 있고 표면적인 임상 조사에서 정상적임에도 불구하고 3회 이상 종부를 시켜도 임신이 되지 않은 경우가 흔히 있는데 이에 대한 요인으로서 영양, 대사성 질병, 호르몬 장애, 자궁 감염, 조기배사멸, 축사 수용 시설, 발정 발견의 효율성, 수정 과정, 환경 등과의 관련성을 지적하고 있다(Lafi and Kaneene, 1992). 특히 세균성으로 인한 자궁 감염은 저 수태우의 주된 원인이 되는데(Singh et al., 2000), Semambo 등(1992)은 *Actinomyces pyogenes*를 접종 후 4시간 만에 자궁으로부터 수정란이 분리되어 배사멸이 일어나는 것을 확인 하였다. 분만 후 자궁 내에 병원성 및 비병원성 박테리아가 존재하면 자궁 수복이 35일 이상으로 소요되기도 하고, 어떤 미생물들은 자궁의 방어기구를 무력화시킴으로써 자궁 내막염을 일으키고 이 미생물들의 활동 과정에서 생성되는 대사성 산물 및 염증성 분비물로 인하여 자궁 내 환경이 변화됨으로써 수태를 방해하게 된다(Akhtar and Singh, 1979).

한편 국내에서의 수정란이식에서 궁극적인 목적인 송아지의 생산을 증가시켜 생산 효율을 높일 뿐만 아니라, 임상적 조건하에서 수정란이식 효율성의 증대가 필요하므로 자궁 내 환경에 대하여 실질적으로 당면하는 문제점들에 대한 연구가 필요하다고 보고된바 있다(Kim et al., 2005). 따라서 본 연구에서는 한우 암소들 중에 2회 이상 번식에 공여하여도 수태가 되지 않는 개체들의 자궁에서 채취한 미생물들이 체내수정란의 발달 및 수태에 미치는 영향을 조사하기 위하여 체외에서 수정란들과 공배양하여 수정란의 발달에 미치는 영향을 구명하였다.

II. 재료 및 방법

1. 한우 암소 자궁 내 미생물 조사

한우 암소 자궁환경 조사를 위해 계절번식을 하여 전년 도 번식불량 한우 10두를 발정동기화후 도축하여 자궁을

적출하였다. 적출된 자궁을 혐기적으로 처리한 후 즉시 30 ml 주사기를 이용하여 Dehority's 배지를 자궁에 주입하여 자궁을 마사지한 후 주입한 배지를 회수하였다. 미생물 검사는 채취한 샘플액 1 ml을 취해서 희석액 9 ml에 넣고 잘 섞었으며, 이렇게 만들어진 10 ml에서 다시 1 ml 취해서 희석액 9 ml에 넣고 잘 혼합하였다. 유산균을 계산 할 수 있는 BCP agar와 총 세균을 계산 할 수 있는 SPC agar, TSA agar를 만들었고, 각각 희석액에서 0.1 ml 취해서 만든 agar에 떨어뜨린 후 스프레딩 하였다. 24 - 48시간 동안 37°C에서 배양 후 꺼내었다. 형성된 콜로니를 따서 동결 바이알에 넣은 후 -70°C에서 보관하였고, 실험을 위하여 균이 필요할 때 마다 동결바이알을 꺼내어 액체배지에 넣어 37°C에 배양하여 시험에 사용하였다.

2. 난포란의 체외성숙

도축장에서 도살 직후 채취된 한우 난소를 37°C 생리식염수가 들어있는 보온병에 담아 실험실로 이동하였다. 난소 표면의 혈액과 이물질을 제거한 후, 18 gauge 주사기를 이용하여 2 - 6 mm 가시난포로부터 난포액을 흡입하였다. 흡입된 난포액은 petri dish에 옮겨, 실제현미경을 사용하여 세포질이 균일한 난자만 선별하여 난자 배양액(HEPES-TCM-199 + 10% FBS)으로 2회 세척 하였다. 세척이 끝난 난자는 35 mm petri dish에 1 - 2 ml 배양액으로 옮겨 다시 3회 세척하였다. 이때 2차선별을 하였고, 4-well dish에 배양액 각각 100 μ l을 넣은 다음 신속하게 30 - 40개의 난포난을 옮겼다. 이후 5% CO₂배양기에서 난자를 22 - 24시간 성숙시켜 체외수정에 이용하였다.

3. 체외수정 및 미생물 첨가 체외배양

체외수정은 성숙된 난포란의 난구세포의 일부를 제거하고, IVF-TALP 배양액에서 체외수정 하였다. 체외수정에 사용된 정액은 한우 동결정액을 사용 하였다. 체외수정에 사용된 정자의 최종농도는 2.0×10^6 cell/ml이 되도록 맞추었고, 6시간동안 CO₂ 5% 배양기에서 배양하였다. 한우의 자궁에서 동정된 미생물을 원심분리 한 후 mSOF 500 μ l를 넣어 두었다. 그 후 자궁에서 동정된 미생물이 원액과 희석액이 포함된 mSOF 용액에 수정된 난자에 붙어 있던 정자를 때어 낸 다음 배양액으로 3번 세척 후 각 mSOF

용액에 난자들을 넣어준 뒤 체외에서 공배양을 하였다.

4. 통계분석

대조군과 미생물을 공배양한 체외수정란 생존율의 차이를 비교하기 위해 SAS 패키지(SAS institute Inc. NC, USA)를 이용하여 만텔 헨즐 카이제곱 검정(Mantel Haenszel chi square test)을 실시하였으며 5% 유의수준에서 차이를 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 한우 암소 자궁 내 미생물 검사

본 연구에서 공시하였던 한우는 번식에 공여하여 교배를 수행하였을 때 수태율이 50% 이하로 떨어지는 한우를 공시하였다. 여러 가지 원인이 존재하겠지만 본 연구에서는 수정란 이식시 수란우의 자궁환경이 불량할 경우 수태율이 저하될 수 있다고 가정 하였다. 한우 암소 10두의 자궁을 적출하여 자궁 내 미생물을 조사 하였다. 그 결과 4두에서는 미생물 검출에 실패 하였고, 2두에서는 자궁환경을 개선하는 동물약품을 처리 하였기에 미생물이 전혀 검출되지 않아 공시축에서 제외하였다. 4두의 자궁에서 조사된 미생물에 대한 결과는 Fig. 1과 같다. 한우 암소 자궁 내 감염된 미생물을 분리 동정하여 조사된 미생물의 균총수에서는 2

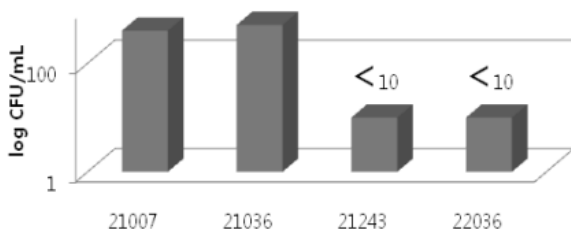


Fig. 1. Total number of microorganisms collected from uterus of each Hanwoo cattle.

Table 1. Various microorganisms collected from uterus of each Hanwoo cattle.

No.	Microorganisms collected from uterus of Hanwoo
21007	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus cereus</i>
21036	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Staphylococcus warneri</i>
21243	<i>Bacillus cereus</i>
22036	<i>Enterococcus faecalis</i>

개 개체에서 100 log CFU/ml 이상 분리 동정된 개체는 2두 있었으며 10 log CFU/ml 이하 분리 동정된 개체가 2두 있었다(Fig. 1). 분리 동정된 미생물의 종류는 총 4가지 종류로 *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), *Bacillus cereus* (*Bc*), *Staphylococcus warneri* (*Sw*) 그리고 *Enterococcus faecalis* (*Ef*) 이었다. 개체별로 검출된 미생물 종류는 Table 1과 같다. *Bt*는 일반적으로 생물학적 살충제(농약)으로 사용되는 그람 양성균으로 토양에 서식하는 세균으로 알려져 있고 세포간 단백질 유리화 독성을 나타내는데 주로 곤충의 에벌레에 만연되어있으며, 생물학적 살충제로 사용되기도 한다(Brock et al., 2009). *Sw*는 포도상구균의 일종으로 거의 질병을 유발시키지는 않지만 때때로 면역체계에 손상을 준다고 보고되고 있다(Barigye et al., 2007). 그리고 *Ef*는 인간과 다른 포유류의 소화관에 상재하고 있는 그람 양성 공생 세균으로서 요로감염증이나 아급성 심내암염에 원인이 된다고 알려져 있다(Ray, 2004). 한우 자궁 내 분리동정된 주요 미생물의 분포는 *Bt*가 42%로 가장 많이 존재하였고, 30% 정도는 분리 동정이 불가능한 균들이 상당수 존재하였다 (data not shown).

2. 한우 암소 자궁 내 미생물이 수정란의 발달에 미치는 영향

자궁 내 미생물이 체내 수정란의 수태율이 미치는 영향을 조사하기 위해 자궁 내에서 분리 동정된 미생물을 체외에서 수정란과 공배양을 실시하여 발달율을 조사하였다. 자궁 내 분리 동정된 미생물 4종을 원액의 균수를 그대로 배양에 공시하였을 때의 결과는 Table 2와 같다. 대조군 68개의 난포란을 공시하여 난분할이 77.9%인 상태가 53개이었으며, 2 cell, 4 - 8 cell, 16 cell, morula, 발달율이 각각 53, 49, 43, 37, 26개로 나타났으며 배반포까지의 발달은 공시된 난자중에 38.2%로 나타났다. 그러나 *Bc*, *Bt*, *Sw*, *Ef*의 원액을 체외발달에 각각 난자 69개, 64개, 18개, 21개를 공배양하여 체외에서 수정란의 발달에 미치는 영향을 조사한 결과에서는 미생물과의 공배양에서 공히 배반포까지 발달하는 수정란은 전무 하였으며, *Bt*의 배반할이 24개(37.5%)로 가장 높은 발달율을 보였으나 수정란들이 배반포까지 발달하지 못하였으며, 특히 *Ef*와의 공배양에서는 공시된 난자가 분할조차도 발생되지 않았다(Table 2). 또한 분리 동정한 미생물의 균종이 배반포 발달에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위하여 자궁 내에서 분리 동정된

Table 2. Effect of microorganisms co-culture on embryo survival in vitro development in Hanwoo cattle.

Treatment	No. of oocytes	Embryonic development					
		Cleavage (%)	2 cell (%)	4~8 cell (%)	16 cell (%)	Morula (%)	Blastocysts (%)
Non	68	53 (77.9)	53 (77.9)	49 (72.1)	43 (64.7)	37 (54.4)	26 (38.2)
<i>Bc</i> ^{a)} (5X10 ⁶)	69	10 (14.5)	10 (14.5)	2 (2.9)	-	-	-
<i>Bt</i> ^{b)} (1X10 ⁷)	64	24 (37.5)	24 (37.5)	15 (23.4)	6 (9.4)	-	-
<i>Sw</i> ^{c)} (1X10 ⁶)	18	1 (5.6)	1 (5.6)	1 (5.6)	-	-	-
<i>Ef</i> ^{d)} (1X10 ⁷)	21	0	-	-	-	-	-
<i>p</i> (Mantel Haenszel χ^2)		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Data are numbers of cell and percentage in each development phase

^{a)}*Bc*: *Bacillus cereus* (CFU/ml)

^{b)}*Bt*: *Bacillus thuringiensis* (CFU/ml)

^{c)}*Sw*: *Staphylococcus warneri* (CFU/ml)

^{d)}*Ef*: *Enterococcus faecalis* (CFU/ml)

Table 3. Effect of number of microorganisms on early embryonic in vitro development in Hanwoo cattle.

Treatment	No. of oocytes	Embryonic development					
		Cleavage (%)	2 cell (%)	4~8 cell (%)	16 cell (%)	Morula (%)	Blastocysts (%)
Non	72	58 (80.6)	58 (80.6)	43 (59.7)	31 (43.1)	26 (36.1)	23 (31.9)
<i>Bc</i> ^{a)} (1X10 ⁴)	75	46 (61.3)	46 (61.3)	38 (50.7)	29 (38.7)	25 (33.3)	21 (28.0)
<i>Bt</i> ^{b)} (1X10 ⁴)	81	50 (61.7)	50 (61.7)	40 (49.4)	36 (44.4)	31 (38.8)	20 (24.7)
<i>Sw</i> ^{c)} (1X10 ⁴)	46	36 (64.0)	36 (64.0)	28 (50.0)	18 (32.0)	10 (18.0)	4 (7.0)
<i>Ef</i> ^{d)} (1X10 ⁴)	42	33 (78.6)	33 (78.6)	25 (59.5)	15 (35.7)	13 (11.9)	1 (2.4)
<i>p</i> (Mantel Haenszel χ^2)		0.883	0.883	0.735	0.120	0.003	0.001

Data are numbers of cell and percentage in each development phase

^{a)}*Bc*: *Bacillus cereus* (CFU/ml)

^{b)}*Bt*: *Bacillus thuringiensis* (CFU/ml)

^{c)}*Sw*: *Staphylococcus warneri* (CFU/ml)

^{d)}*Ef*: *Enterococcus faecalis* (CFU/ml)

미생물의 균수를 Table 3과 같이 균수를 똑같이 조절하여 배양에 공시하였다. 그 결과 대조구와 시험군을 체외에서 난자와 공배양하였을 때 난분할은 대조구, *Bc*, *Bt*, *Sw*, *Ef* 각각 58(80.6%), 46(61.3%), 50(61.7%), 36(78.6%)이었으며, 배반포에서는 각각 23(31.9%), 21(28%), 20(24.7%), 4(7.0%), 1(2.4%)로 발달하였다. 특이하게 난분할에서는 전부 60% 이상의 확률을 보였지만 배반포 단계에서 *Sw*,

*Ef*에서 현저하게 낮은 것을 확인 할 수 있었다. *Sw*의 경우 소와 인간의 자연유산의 원인(Barigye et al., 2007)으로 제시되고 있고 요로감염(Announ et al., 2004), 수막염(Leighton et al., 1986), 등 많은 질병의 원인으로도 보고되었다. 이러한 결과들을 미루어 볼 때 *Sw* 및 *Ef*들이 자궁 내 수정란의 발달, 착상 및 수태율 저하에 많은 영향을 미칠 수 있을 것을 사료된다.

V. 결론

본 시험은 한우 자궁 내 환경이 수정란 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 한우를 발정동기화하여 도축하였고, 자궁을 적출하여 자궁 내 미생물을 분리 동정한 결과 *Bc*, *Bt*, *Sw*, *Ef*들이 조사되었다. 이 분리된 균들이 한우 수정란의 발달에 미치는 영향을 조사한 결과 분리 동정된 균수를 원액으로 공배양한 결과에서는 배분할 자체도 발생되지 않는 경우도 있었으며, 미생물 균총수를 10^4 CFU/ml로 조정하였을 때에는 *Sw*, *Ef*에서 저조한 배반포율을 나타냈다. 결론적으로 본 연구에서 분리 동정된 자궁 내 미생물이 10^4 CFU/ml 이상 되었을 때 암소 체내 수정란을 이식하였을 때 체내 발달과 수태율에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청연구사업(과제번호PJ01099201)의 지원에 의해 이루어진 것임.

본 연구는 2015년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

참고 문헌

- Ahlers D, Grunert E. 1993. Zur Problematik der Behandlung des infizierten Uterus beim Rind im Puerperium. *Prakt Tierarzt Sonderh Coll Vet* 24:57-62.
- Akhtar M, Singh B. 1979. Livability and fertility rate of spermatozoa in bovine cervical mucus under normal and disease conditions [dairy cattle, India]. *Indian Veterinary Journal (India)*.
- Announ N, Mattei JP, Jaoua S, Fenollar F, Sati H, Chagnaud C, Roudier J, Guis S. 2004. Multifocal discitis caused by *Staphylococcus warneri*. *Joint Bone Spine* 71(3):240-242.
- Barigye R, Schaan L, Gibbs PS, Schamber E, Dyer NW. 2007. Diagnostic evidence of *Staphylococcus warneri* as a possible cause of bovine abortion. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 19(6):694-696.
- Boland M, Crosby T, Gordon I. 1976. Birth of twin calves following a simple transcervical non-surgical egg transfer technique. *Veterinary Record* 99(14):274-275.
- Broadbent P, Stewart M, Dolman D. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology* 35(1):125-139.
- Brock T, Madigan MT, Martinko J, Parker J. 2009. *Brock's Biology of Microorganisms*. Pearson Benjamin Cummings Press: San Francisco, CA, USA.
- Christensen LG. 1991. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology* 35(1):141-149.
- Donaldson L. 1985. Matching of embryo stages and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. *The Veterinary Record* 117(19):489-491.
- Hussain A, Daniel R. 1992. Phagocytosis by uterine fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows following normal and abnormal parturition. *Theriogenology* 37(6):1253-1267.
- Jainudeen M, Hafez E. 1993. Reproductive failure in females. *Reproduction In Farm Animals* 6th ed Lea & Febiger, Philadelphia: 261-286.
- Kim S, Park Y, Park H, Park H, Kim J. 2005. Effect of Embryo Factors on Pregnancy and Abortion Rate after Transfer of In Vitro Produced Korean Native Cattle Embryos. *Korean Journal of Embryo Transfer*. 20(1):17-24. [in Korean]
- Lafi S, Kaneene J. 1992. Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. I. Epidemiological modeling. *Preventive Veterinary Medicine* 14(1):87-98.
- Laven R, Peters A. 1996. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. *The Veterinary Record* 139(19):465-471.
- Leighton P, Little J. 1986. Identification of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from urinary tract infections. *American journal of clinical pathology* 85(1):92-95.
- Mellado M, Reyes C. 1994. Associations between periparturient disorders and reproductive efficiency in Holstein cows in northern Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 19(3):203-212.
- Nelson LD, Nelson CF. 1985. Effect of estrus detection and corpus luteum development on pregnancy rates in bovine embryo recipients. *Theriogenology* 23(1):212.
- Ray C. 2004. *Sherris medical microbiology*. McGraw Hill.
- Semambo D, Eckersall P, Sasser R, Ayliffe T. 1992. Pregnancy-specific protein B and progesterone in monitoring viability of the embryo in early pregnancy in the cow after experimental infection with *Actinomyces pyogenes*. *Theriogenology* 37(3):741-748.
- Singh J, Sidhu S, Dhaliwal G, Pangaonkar G, Nanda A, Grewal A. 2000. Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Animal reproduction science* 59(3):159-166.
- Sreenan J. Methods of consistent supply, recovery and transfer of embryos in cattle; 1983. p 197-212.
- Sreenan J, Diskin M. 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology* 27(1):99-113.
- Walton J, Martineau N, Stubbings R. 1986. Pregnancy rates in Holstein embryo transfer recipients: effect of treatment with progesterone or clenbuterol and of natural versus induced cycles. *Theriogenology* 26(6):837-845.
- Wright JM. 1981. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology* 15(1):43-56.