

소 난포란의 체외배양에 있어서 소 동결정액유래 미생물 억제에 관한 연구

이성학 · 정구민¹ · 이종호 · 가학현 · 임경순
서울대학교 농업생명과학대학 동물자원학과

Study on Inhibition of Microorganism Derived from Bovine Frozen Semen in *In Vitro* Culture of Bovine Follicular Oocytes

Lee, S. H., K. M. Chung¹, J. H. Lee, H. H. Ka and K. S. Im
Department of Animal Science & Technology, College of Agriculture and
Life Science, Seoul National University

SUMMARY

This study was accomplished to illuminate factors of contamination of microbes in the culture medium and effect of antibiotics on prevention of contamination in the medium when bovine follicular oocyte was matured, fertilized and developed *in vitro*.

1. When washed or unwashed semen diluted with TCM 199 was incubated for 24~72hr, contamination was come out.
2. When diluted semen with TCM 199 which has penicillin, streptomycin, gentamycin, kanamycin or nystatin was incubated for 24~72hr, contamination was not come out only in kanamycin.
3. When imported semen which was diluted in TCM 199 with penicillin, streptomycin, gentamycin, kanamycin or nystatin was incubated for 24~72hr, contamination was not come out in all treatments.
4. When semen which was diluted in BO, CZB, Ham's F10 or TCM 199 was incubated for 24~72hr, kanamycin showed no contamination in all treatments, but gentamycin showed contamination in CZB, Ham's F10 and TCM 199.
5. When the semen diluted in BO was moved at 24hr after incubation into BO and incubated for 72hr, contamination was not come out, but when it was moved into the TCM 199 and incubated for 72hr, contamination was come out at 48 to 72hr of incubation.
6. When the semen diluted in BO, BO+BSA or BO+FBS containing gentamycin, kanamycin or nystatin was incubated for 24~72hr, the diluted semen in BO or BO+BSA showed no contamination in all antibiotics but the diluted semen in BO+FBS showed no contamination only in kanamycin.
7. The *Pseudomonas cepacia*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae* was respectively isolated

¹ 한국생명과학연구소(Hankook Institute of Life Science)

in the semen of A, B, and C bull and the microbes are highly affected by amikacin, tobramycin and kanamycin.

8. When bovine follicular oocyte was *in vitro* matured, fertilized and developed in the simple medium with kanamycin, 26.6% was developed to over 32cell stage embryo.

I. 서 론

소의 인공수정이 발달하면서 동결정액의 중요성이 부각되어 왔으며, 동결정액에 있어서 항생제의 첨가가 정자의 운동성과 수정능력 및 미생물억제에 미치는 영향에 관한 연구가 많이 수행되어 왔다(Almqvist 등, 1951a, 1974b; Hamdy 등, 1971; Truscott 등, 1977; Ahmad 등, 1986a, 1987b,c). 최근 소의 난포란의 체외수정에 관한 연구가 활발히 진행되어 체외수정란을 이식하여 신생자가 태어났다고 보고되고 있다(황 등, 1993; 한 등 1994; 박 등 1994). 그러나 소의 체외수정란으로 신생자를 생산하는 성공률은 그리 높지 않다. 그 이유 중 하나는 소 수정란의 체외배양시 발생하는 미생물에 의한 배양액 오염이다.

본 실험에서는 배양액에 있어서 미생물의 오염의 원인을 규명하기 위하여 난포란, 정자 및 수정란의 조작과정중 오염의 가능성을 면밀히 조사하였다. 특히 체외수정에 사용하는 동결정액과 종용우의 개체에서 유래하는 오염의 가능성을 검토하였다. 또한 체외수정시 발생하는 미생물의 성장을 억제하는 항생제의 효과에 대하여도 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 정 자

한우개량사업소에서 구입한 한우 동결정액을 39℃에서 30초간 용해한 후 정액을 caffeine이 첨가된 BO(Brackett와 Oliphant, 1975) 배양액으로 희석하여, 500g에 10분간 2회 원심분리한 후 사용하였다(Niwa 등, 1988).

2. 정액배양

세척한 정액은 24 well dish(Falcon, Cat No. 3047)에 배양하였으며, 각 well에 배양액 0.8ml, 항생제 0.1ml, 동결정액 0.1ml을 첨가하여 전체부피가 1.

0ml이 되도록 조정하였으며, 정자는 2×10^6 /ml을 첨가하였다. 각 well을 mineral oil로 피복하고 dish를 5% 탄산가스배양기에서 72시간 배양하면서, 배양후 24, 48, 72시간에 미생물의 오염 여부를 각각 관찰하였다.

3. 배양액 및 항생제

배양액은 단순배양액으로 BO와 CZB(Chatot 등, 1989)를, 복합배양액으로 Ham's F10과 TCM199를 사용하였다. 공급된 단백질원은 0.3% BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma Cat. No A-4378)와 10% FBS(Fetal Calf Serum, Hyclone Lab. Cat. No A-1111-L)를 사용하였다. 항생제는 penicillin 50 μ g/ml(Sigma), streptomycin 50 μ g/ml(Sigma), gentamycin 50 μ g/ml(Sigma), kanamycin 50 μ g/ml(동아제약), nystatin 50 μ g/ml(한국스퀴브)를 각각 첨가하였다.

4. 미생물 발생의 판정 및 동정

배양액의 색변화를 육안으로 관찰하여 미생물의 발생 여부를 판정하였으며(Fig. 1), 미생물 발현이 확인된 시료는 서울임상병리검사센터(SCL)에 의뢰하여 미생물을 동정하였다.

III. 결 과

1. 종용우 개체별 미생물의 발생

동결정액을 용해한 후 세척을 한 정액과 세척을 하지 않는 정액을 TCM-199에 배양한 결과는 Table 1과 같다.

정액을 첨가하지 않고 배양액만 배양한 경우 배양 24, 48 및 72시간에서 미생물의 오염이 발생되지 않았으나, 세척하지 않은 정액과 세척한 정액을 첨가한 구에서는 모두 배양 24시간부터 미생물의 오염이 발생하여 72시간까지 지속되었다.

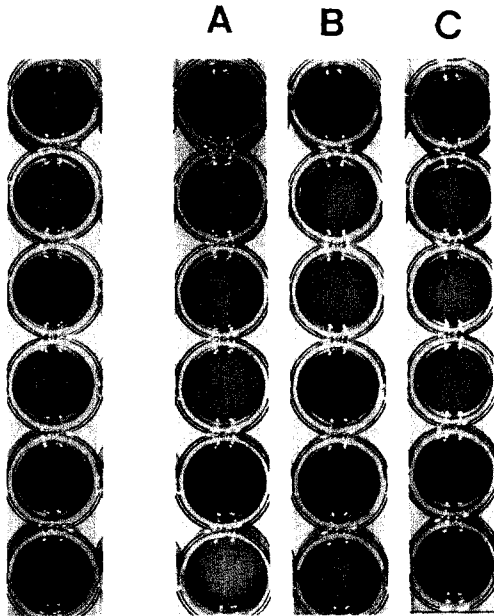


Fig. 1. Determination of contamination of microorganism by changes of colors from pink to yellow in TCM 199 after culture for 48hrs.

A,B,C: bulls, CI: TCM only, CII: TCM + semen, PS: penicillin+streptomycin G: gentamycin, K: kanamycin, N: nystatin.

2. 항생제의 첨가효과

종용우 3 개체의 동결정액을 TCM199로 희석하고 5종의 항생제를 각각 첨가하여 72시간 배양하였을 때 미생물의 발현은 Table 2와 같다.

TCM과 kanamycin 첨가구에서는 오염이 관찰되지 않았으나 penicillin, streptomycin, gentamycin 및 nystatin 첨가구에서는 오염이 관찰되었다. Gentamycin은 종용우 3개체 중 B개체에서 오염이 관찰되지 않아 종용우에 따라 미생물의 성장을 억제할 수 있었다.

국내에서 제조된 동결정액과 수입된 동결정액을 비교한 결과는 Table 3과 같다.

수입정액의 경우 어느 항생물질처리에서도 오염이 발생되지 않았으나, 국내에서 제조된 정액은 kanamycin을 제외한 항생제에서 오염이 발생하였다.

3. 배양액의 종류

단순배양액인 BO와 CZB 및 복합배양액인 Ham's F10 과 TCM-199를 사용하였을 때 오염의 발생양상은 Table 4와 같다.

BO배양액에서는 배양 72시간까지 5개 전처리구 공히 미생물의 오염이 발생하지 않았으나, CZB에서는 배양 48시간에 정액과 nystatin에서 미생물의 오염이 발생하였다. Ham's F10과 TCM199에서는 정액과 nystatin에서 배양 24시간부터 오염이 발생하였다. 그리고 TCM 199에서는 gentamycin 첨가구에서 배양 48시간부터 오염이 발생하였다. Kanamycin을 처리한 실험구에서는 배양액의 종류에 상관없이 오염이 발생하지 않았다.

BO배양액의 희석정액을 배양 후 24시간에 복합배양액인 TCM199로 희석하여 72시간 배양했을 때 오염에 미치는 영향은 Table 5와 같다. BO의 희석정액에서는 배양 72시간까지 오염이 발생하지 않았으나, BO희석정액을 배양 24시간에 복합배양액인 TCM199로 희석하였을 때는 배양 48시간 이후 오염이 발생하

Table 1. Effect of bull and semen washing on contamination of microorganism in TCM 199

| Treatment | Bulls | | | | | | | | |
|----------------------|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | A | | | B | | | C | | |
| | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 |
| TCM 199 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TCM + washed semen | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| TCM + unwashed semen | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

- : not contaminated, + : contaminated, 24, 48 and 72 means culture hours.

Table 2. Effect of bull and antibiotics on contamination of microorganism in TCM 199

| Treatment | Bulls | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | A | | | B | | | C | | |
| | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 |
| TCM 199 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TCM + semen + penicillin | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| TCM + semen + streptomycin | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| TCM + semen + gentamycin | + | + | + | - | - | - | + | + | + |
| TCM + semen + kanamycin | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TCM + semen + nystatin | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

- : not contaminated, + : contaminated, 24, 48 and 72 means culture hours

Table 3. Effect of KNC frozen semen and imported frozen semen on contamination in TCM 199

| Treatment | Bulls | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|----|----|------------|----|----|------------|----|----|
| | KNC A | | | Imported A | | | Imported B | | |
| | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 |
| TCM 199 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TCM + semen + penicillin | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| TCM + semen + streptomycin | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| TCM + semen + gentamycin | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| TCM + semen + kanamycin | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TCM + semen + nystatin | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

- : not contaminated, + : contaminated, 24, 48 and 72 means culture hours

Table 4. Effect of different media and antibiotics on contamination of microorganism in diluted semen

| Treatment | Media | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------|----|----|-----|----|----|-----------|----|----|---------|----|----|
| | BO | | | CZB | | | Ham's F10 | | | TCM 199 | | |
| | 24 | 28 | 72 | 24 | 28 | 72 | 24 | 28 | 72 | 24 | 28 | 72 |
| TCM 199 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TCM + semen | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| TCM + gentamycin | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| TCM + kanamycin | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TCM + nystatin | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |

- : not contaminated, + : contaminated, 24, 48 and 72 means culture hours

였다.

4. 단백질원의 종류

0.3% BSA 또는 10% FBS를 첨가한 BO배양액으로 정액을 희석하였을 때 항생물질의 종류가 오염의

발생에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 6과 같다. BO와 BO + BSA에서는 전처리에서 오염이 발생하지 않았으나, BO + FBS에서는 semen, gentamycin 및 nystatin에서 48시간부터 오염이 발생하였으며, TCM + kanamycin에서는 오염이 발생하지 않

Table 5. Effects of transfer of BO to TCM 199 on contamination of microorganism in diluted semen

| Medium | | Culture(hr) | | |
|--------|---------|-------------|----|----|
| 0~24hr | 24~72hr | 24 | 48 | 72 |
| BO | BO | - | - | - |
| BO | TCM | - | + | + |

- : not contaminated + : contaminated

Table 6. Effect of antibiotics and protein sources on contamination of microorganism in BO diluted semen

| Treatment | Protein source | | | | | | | | |
|------------------|----------------|----|----|--------|----|----|--------|----|----|
| | BO | | | BO+BSA | | | BO+FBS | | |
| | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 | 24 | 48 | 72 |
| TCM 199 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TCM + semen | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| TCM + gentamycin | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| TCM + kanamycin | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TCM + nystatin | - | - | - | - | - | - | - | + | + |

- : not contaminated, + : contaminated, 24, 48 and 72 means culture hours

Table 7. Identification of bacteria in thawing bovine semen and effect of antibiotics on inhibition of microorganisms.

| Antibiotics | Bulls | | |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | A | B | C |
| | <i>Pseudomonas cepacia</i> * | <i>Serratia liquefaciens</i> * | <i>Klebsiella pneumoniae</i> * |
| Semen + amikacin | S | S | S |
| Semen + ampicillin | R | R | R |
| Semen + carbenicillin | R | R | R |
| Semen + cephalothin | R | R | S |
| Semen + chloramphenicol | R | R | R |
| Semen + tobramycin | S | S | S |
| Semen + kanamycin | S | S | S |
| Semen + tetracyclin | S | R | R |

S : susceptible, R : resistant, * : Microorganism

았다.

5. 미생물 동정

미생물의 오염이 발생한 배양액을 서울임상병리검 사센터에 의뢰하여 미생물을 동정하고 항생물질을 첨 가했을 때 미생물의 억제에 미치는 영향은 Table 7과

같다. 종용우의 정액에 따라 우점하고 있는 미생물의 종이 달랐다. 미생물들은 amikacin, tobramycin 및 kanamycin에 민감하였다.

6. Kanamycin의 첨가와 난포란의 발달

오염을 억제하는 것으로 밝혀진 kanamycin을 첨가

Table 8. Development of bovine embryos treated with kanamycin

| Treatment | No. of Oocyte | Embryo stage | | |
|---------------------------|---------------|--------------|----------|----------|
| | | ≥2cell | ≥8cell | ≥Morula |
| Penicillin + streptomycin | 87 | 49(56.3) | 31(35.6) | 19(21.8) |
| Kanamycin | 75 | 40(53.3) | 30(40.0) | 20(26.6) |

() : %

한 단순배양액에서 소난포란을 체외수정시켰을 때 수정란의 발달율은 Table 8과 같다. 2세포, 8세포와 32세포 이상의 배로의 발달율은 penicillin + streptomycin이 각각 56.3, 35.6 및 21.8%였으며, kanamycin은 각각 53.3, 40.0 및 26.6%로 32세포배의 발달율에서 kanamycin이 penicillin + streptomycin보다 약간 높았다.

IV. 고 찰

한우는 국내 고유한 유전자원으로 한우를 지켜나가기 위해서는 우수한 유전능력을 가진 종용우의 정액을 동결정액으로 생산하여 보급하여야 한다. 최근 널리 연구되고 있는 시험관 송아지와 핵이식 송아지를 생산하기 위해서 양질의 동결정액이 체외수정에서 활용되고 있다. 시험관 내에서 난자와 정자의 배양은 정자와 난자 유래의 미생물에 의한 오염, 특히 동결정액에서 유래한 미생물에 의한 오염을 방지함으로써 체외수정란의 높은 발달율을 확보할 수 있다.

한편, 실험에서 kanamycin은 회석정액의 배양액에서 미생물의 오염을 효과적으로 방지하였다. 배양액에 kanamycin 50 µg/ml를 첨가하여 체외수정란을 배양하였는데 배의 발달에 나쁜 영향을 미치지 않았다.

수입 동결정액과 한우 동결정액을 유희후 배양한 결과 한우 동결정액에서는 24시간 후에 오염이 발생되었으나, 외국 동결정액에는 72시간까지 오염이 발생하지 않았다. 한우동결정액에서 오염이 발생한 것은 종용우의 정액에서 유래했다기 보다는 동결정액 제조과정에서 유래된 것으로 생각된다. 특히 동결된 미생물 중에서 토양에서 발견되는 미생물이 있는 것으로 보아 정액채취과정에서 유입된 먼지 또는 동결정액 제조시 사용되는 난황에서 유래한 것이 아닌가 생각되며 이에 대해서는 보다 면밀한 연구가 있어야 할 것으로 생각

된다.

V. 적 요

본 연구는 소의 난포란을 체외에서 성숙, 수정 및 발생시킬 때 배양액에 나타나는 미생물의 오염원인과 항생물질 첨가가 배양액의 오염방지에 미치는 효과를 규명하기 위하여 실시하였다.

1. 세척한 정액 또는 세척하지 않은 정액을 TCM 199로 희석하여 24~72시간 배양하였을 때 미생물의 오염이 발생하였다.
2. TCM199 희석정액에 penicillin, streptomycin, gentamycin, kanamycin 또는 nystatin을 첨가하여 24~72시간 배양하였을 때 kanamycin 첨가에서만 미생물의 오염이 발생하지 않았다.
3. 수입정액을 TCM199로 희석하여 penicillin, streptomycin, gentamycin, kanamycin 또는 nystatin을 첨가하여 24~72시간 배양하였을 때 모든 항생물질 첨가구에서 미생물의 오염이 발생하지 않았다.
4. 정액을 BO, CZB, Ham's F10 또는 TCM199로 희석하여 24~72시간 배양하였을 때 kanamycin은 모든 배양액의 회석정액에서 오염이 발생하지 않았으나, gentamycin은 TCM 회석정액에서, nystatin은 CZB, Ham's F10과 TCM 회석정액에서 각각 미생물의 오염이 발생하였다.
5. BO희석정액을 배양후 24시간에 BO액에 옮겨 72시간까지 배양했을 때는 미생물의 오염이 발생하지 않았으나, TCM에 옮겨졌을 때는 48~72시간에 미생물의 오염이 발생하였다.
6. 정액을 BO, BO+BSA 또는 BO+FBS에 희석하여 gentamycin, kanamycin 또는 nystatin을 첨가하여 24~72 시간 배양했을 때 BO와 BO+

BSA 회석정액 에서는 3개 항생물질 첨가구 모 두에서 미생물의 오염이 없었으나, BO+FBS 회석정액에서는 kanamycin첨가에서만 미생물 의 오염이 없었다.

7. A, B, C 종용우의 정액에서 *Pseudomonas cep-acia*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneum-oniae*의 미생물이 각각 동정되었으며, 이들 미생 물은 amikacin, tobramycin과 kanamycin에 대하여 감수성이 높았다.
8. 단순배양액에 kanamycin을 첨가하여 소난포란 을 체외 성숙, 수정 및 발생시켰을 때 26.6%가 32세포기 이상의 배로 발달하였다.

VI. 인용문헌

1. Ahmad, K., R. H. Foote. 1986a. Postthaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent. J. Dairy. Sci., 69:535-541.
2. Ahmad, K., R. H. Foote. 1987b. Antibiotics for bull semen frozen in milk and egg yolk extenders. J. Dairy Sci., 70:2439-2443.
3. Ahmad, K., R. H. Foote. 1987c. Motility and fertility of frozen bull spermatozoa in tris-yolk and milk extenders containing amikacin sulfate. J. Dairy Sci., 68:2083-3086.
4. Almquist, J. O. 1951a. A comparison of penicillin, streptomycin and sulfanilamide for improving the fertility of semen from bulls of low fertility. J. Dairy Sci., 34:819-822.
5. Almquist, J. O., N. L. Zaugg. 1974b. Fertility of bovine semen in milk diluent containing combinations of penicillin-neomycin and lincomycin-spectinomycin. J. Dairy Sci., 57:1211-1213.
6. Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 12:260-274.
7. Charot, C. L., C. A. Ziomek., B. D. Bavister. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. J. Reprod. Fert., 86:679-688.
8. Hamdy, A. H., C. C. Miller. 1971. Antibiotics for bovine mycoplasmas. J. Dairy Sci., 54:1541-1544.
9. Niwa, K. and O. Ohgoda. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. Therio., 30:733-741.
10. Truscott, R. B., C. Abreo. 1977. Antibiotics for elimination of mycoplasmas and ureaplasma from bovine semen. J. Dairy Sci., 60:954-960.
11. 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. 한국수정란이식학회지, 8:143-149.
12. 한용만, 이철상, 이정호, 김선정, 신상태, 김동훈, 이훈택, 정병현, 정길생, 김영수, 김영훈, 이곤세, 김교국, 황윤식, 이경광. 1994. 체외수정란 유래의 송아지 생산. 한국가축번식학회지, 18:7-13.
13. 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영근, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 광대오, 이효종, 최상용. 1994. 한국가축번식학회지, 18:47-54.