

ПІДВИЩЕННЯ ЯКІСНИХ ХАРАКТЕРИСТИК РОЗБАВЛЮВАЧІВ СПЕРМИ КНУРІВ

*Т. І. Стецько, канд. с.-г. наук,
Л. Л. Островська, канд. вет. наук,
І. Є. Атаманюк, старший науковий співробітник,
Г. П. Угрин, молодший науковий співробітник
О. І. Хом'як, провідний лікар вет. медицини*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

Ефективність штучного осіменіння значною мірою залежить від санітарної якості сперми плідників, середовищ і речовин, які застосовуються при розбавленні сперми. Збереження життєздатності спермій у розбавленій спермі кнурів є однією з актуальних проблем репродуктивної біотехнології.

*У статті наведені результати вивчення чутливості бактерій-ізолятів, виділених зі сперми кнурів, до антибіотиків різних фармакологічних груп, а також визначення мінімальниці інгібуючої концентрації (МІК) антибіотиків для *Pseudomonas aeruginosa*. Згідно отриманих даних, мікроорганізми-контаміанти сперми кнурів найбільш чутливими були до енрофлоксацину, гентаміцину, стрептоміцину, колістину, спектиномицину, сульфадіазину. За рівнем бактеріостатичної активності антибіотиків *Pseudomonas aeruginosa* виявилася найбільш чутливою до енрофлоксацину (МІК = 0,75 мкг/мл).*

Енрофлоксацин і гентаміцин проявляли незначну токсичну дію на спермій кнурів у концентраціях 800 мкг/см³ у розбавлювачі сперми на основі глюкозо-хелато-цитрато-сульфатного середовища. За нижчих концентрацій (600 мкг/см³ і менше) обох антибіотиків показник абсолютного виживання спермій залишався на високому рівні.

Ключові слова: СПЕРМА КНУРІВ, СПЕРМІЇ, ВИЖИВАННЯ, АНТИБІОТИКИ, ЧУТЛИВІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ, МІНІМАЛЬНА ІНГІБУЮЧА КОНЦЕНТРАЦІЯ, РОЗБАВЛЮВАЧ СПЕРМИ.

Сперма плідників, яка використовується при штучному осіменінні маточного поголів'я, повинна відповідати певним санітарним вимогам, передбаченими нормативними документами, а препарати, що використовуються для розбавлення і зберігання сперми повинні бути нешкідливими для спермій [1].

Вплив мікрофлори сперми на біологічну якість і здатність до запліднення спермій досліджено багатьма вченими [2-4]. Мікроорганізми виробляють бактеріолізینی, бактеріоаглютиніни, які можуть викликати аглютинацію і загибель статевих клітин. Різні види умовно-патогенних мікроорганізмів утворюють цілий ряд токсичних сполук, таких як індол, скатол, сірководень, кадаверин та ін, які негативно впливають на біологічні властивості спермій [2, 4]. Попередніми нашими дослідженнями встановлено, що мікробна забрудненість нативної сперми становила $2,8 \times 10^3 - 1,6 \times 10^4$ КУО/см³, а з неї виділяли бактерії групи *Escherichia coli* – 32 %, *Streptococcus spp.* – 28 %, *Staphylococcus spp.* – 20 %, *Pseudomonas aeruginosa* – 16 %, *Bacillus subtilis* – 4 % [5-6]. Тому пригнічення небажаної дії мікробів-контаміантів у спермі плідників є обов'язковою умовою при штучному осіменінні маточного поголів'я.

Ефективним засобом деконтамінації сперми є санація її антимікробними препаратами.

Складність у вирішенні проблеми санації сперми полягає ще і в тому, що поряд із створенням у середовищах для розбавлення сперми бактерицидних умов, повинна зберігатися запліднююча здатність сперміїв. Основними вимогами до сануючих речовин (антибіотиків, сульфаніламідних та інших хіміотерапевтичних препаратів) є їх висока бактерицидна активність і нетоксичність для сперміїв. Відтак, високі вимоги до якості розбавлювачів сперми потребують постійного їх удосконалення [7-10].

Метою роботи було вивчення видового складу мікроорганізмів-контамінантів сперми кнурів та їх чутливості до антибіотиків для оптимального вибору активно діючої основи нового сануючого препарату для сперми кнурів.

Матеріали і методи. Для дослідження було відібрано п'ять клінічно здорових статевозрілих кнурів, які належать ПП "Похальський". Сперму від кнурів відбирали мануальним методом, який дозволяє проводити відбір продуктивних фракцій сперми і є найчистішим методом відбору сперми. Визначали санітарні та біологічні показники як нативної сперми кнурів, так і розбавленої глюкозо-хелато-цитратно-сульфатним середовищем (ГХЦС).

Встановлювали чутливість мікрофлори сперми кнурів до окремих антибактеріальних речовин. Чутливість мікроорганізмів визначали методом дифузії в агар з використанням стандартних дисків з антимікробними речовинами та середовища Мюллера-Хінтона, виробництва HiMediaLaboratories Pvt. Ltd. [11]. Отримані результати тесту на чутливість мікроорганізмів до антибіотиків інтерпретували згідно Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals [12].

Проводили виділення та ідентифікацію мікроорганізмів сперми кнурів. Виділення бактерій-ізолятів проводили загальноприйнятими мікробіологічними методами з використанням звичайних і спеціальних поживних середовищ. Ідентифікували мікроорганізми за їх культуральними та ферментативними властивостями, застосовували комбіновані середовища (Ендо і сольовий агар), напіврідкі середовища з цукрами (кольоровий ряд).

Встановлювали рівень бактериостатичної активності антибіотиків різних фармакологічних груп щодо ізолятів *Pseudomonas aeruginosa* (як основного мікроорганізму-контамінанту сперми кнурів) шляхом визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) антимікробних речовин для виділених штамів синьогнійної палички. МІК антибіотиків визначали методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі []. Отримані результати тесту на чутливість мікроорганізмів до антибіотиків інтерпретували згідно Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals [12].

Біологічні показники якості сперми (абсолютне виживання та виживання у годинах) визначали за показниками рухливості сперміїв у процесі зберігання за температури 16-20 °С. Для визначення дослідження абсолютного виживання (S) та часу виживання сперміїв (T) у розбавлену ГХЦС середовищем сперму кнурів вносили енрофлоксацин і гентаміцин у концентраціях від 100 до 800 мкг/см³. В якості контролю використовували зразки цієї ж сперми без сануючих препаратів.

Результати й обговорення. Мікробна забрудненість нативної сперми кнурів становила від $2,4 \times 10^4$ КУО/см³ до $5,6 \times 10^4$ КУО/см³, що свідчить про її високу забрудненість.

Результати тесту на чутливість мікрофлори сперми кнурів до антибіотиків наведена у таблиці 1.

Як видно з наведених у таблиці 1 даних, найбільш чутливою мікрофлора сперми кнурів виявилася чутливою до гентаміцину, енрофлоксацину, колістину, стрептоміцину, спектиноміцину, сульфадіазину. Резистентними мікроорганізми сперми були до тилозину, доксицикліну, ампіциліну, триметоприму і клоксациліну.

Чутливість мікрофлори сперми кнурів до антибіотиків (n = 5)

Антибіотики	Діаметри зон затримки росту, мм (M±m)	Рівень чутливості
Доксицилін	-	Резистентна
Ампіцилін	-	Резистентна
Окситетрациклін	23 ± 2,5	Чутлива
Гентаміцин	27 ± 2,4	Чутлива
Неоміцин	19 ± 2,0	Чутлива
Енрофлоксацин	35 ± 2,1	Чутлива
Колістин	16 ± 1,7	Чутлива
Стрептоміцин	23 ± 2,8	Чутлива
Клоксацилін	-	резистентна
Тилозин	12 ± 2,1	резистентна
Триметоприм	-	резистентна
Сульфадіазин	28 ± 1,8	чутлива
Спектиноміцин	27 ± 1,2	чутлива

При аналізі проб як нативної, так і розбавленої сперми загально прийнятими мікробіологічними методами були виділені та ідентифіковані бактерії *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Результати визначення МІК антибіотиків для *Pseudomonas aeruginosa* наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

МІК антибіотиків для *Pseudomonas aeruginosa*

Концентрація, мкг/см ³	Антибіотики				
	Енрофлоксацин	Гентаміцин	Неоміцин	Окситетрациклін	Колістин
50	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
12,5	-	-	+	-	-
6,2	-	-	+	+	-
3,1	-	+	+	+	+
1,5	-	+	+	+	+
0,75	-	+	+	+	+
0,37	+	+	+	+	+
0,17	+		+	+	+
Контроль	+	+	+	+	+

Примітка: «+» - ріст присутній; «-» - ріст відсутній.

Найнижче значення мінімальної інгібуючої концентрації для синьогнійної палички, а відтак високий рівень бактеріостатичної активності, встановлено для енрофлоксацину (МІК = 0,75 мкг/мл). Інші антибіотики за значеннями МІК були помірно чутливими до ізоляту *Pseudomonas aeruginosa*.

Результати дослідження абсолютного виживання (S) та часу виживання спермійів (T) за дії енрофлоксацину і гентаміцину у різних концентраціях наведені у таблиці 3.

Як впливає з результатів, наведених у таблиці 3, енрофлоксацин і гентаміцин проявляли незначну токсичну дію на спермійів кнурів у концентраціях 800 мкг/см³, за нижчих концентрацій (600 мкг/см³ і менше) обох антибіотиків у розбавлювачі сперми показник абсолютного виживання спермійів залишався на високому рівні. Подібні результати отримані щодо часу виживання спермійів.

Абсолютне виживання та час виживання спермійв за дії енрофлоксацину і гентаміцину у різних концентраціях

№ проби	Концентрація мкг/см ³	Енрофлоксацин				Гентаміцин			
		S	S, % до контролю	T, год	T, % до контролю	S	S, % до контролю	T, год	T, % до контролю
1	100	981	118,9	225	119,0	993	120,0	210	121,4
2	200	1035	125,4	228	120,6	993	120,0	210	121,4
3	300	1041	126,2	228	120,6	1122	136,5	231	133,5
4	400	1041	126,2	228	120,6	1105	134,4	235	135,8
5	500	1065	129,1	228	120,6	1036	126,0	231	133,5
6	600	1065	129,1	231	122,2	1021	124,2	211	121,9
7	800	960	109,1	199	105,3	904	110,0	180	104
8	Контроль	825	100,0	189	100,0	822	100,0	173	100

В И С Н О В К И

Нативна сперма кнурів, зазвичай, характеризується високим ступенем бактеріального забруднення. Її мікрофлора представлена як грампозитивними, так і грамнегативними бактеріями. Мікроорганізми, контамінанти сперми кнурів, проявляють чутливість до одних (енрофлоксацин, гентаміцин, колістин, стрептоміцин, спектиноміцин, сульфадіазин) і резистентність до інших (тилозин, доксициклін, ампіцилін, триметоприм, клоксацилін) антибіотиків. Найвищий рівень чутливості у виділеній зі сперми кнурів синьогнійна паличка спостерігається до енрофлоксацину. Введення у склад розбавлювача сперми енрофлоксацину і гентаміцину в концентраціях, не вищих за 600 мкг/см³, суттєво не впливало показники абсолютного виживання та часу виживання спермійв.

Перспективи досліджень. У наступних дослідженнях буде детальніше вивчена можливість застосування енрофлоксацину і гентаміцину як складових частин сануючого препарату для сперми кнурів, його вплив на хід окисно-відновних процесів у сперміях, їх запліднюючу здатність.

IMPROVING OF QUALITY CHARACTERISTICS OF BOAR' SPERM DILUENTS

T. I. Stetsko, L. L. Ostrovska, I. Ye. Atamaniuk, H. P. Ugryn, O. I. Homjak

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

The effectiveness of artificial insemination to a large extent depends on the sanitary quality of the sperm of the breeders, media and substances that are used in the dilution of sperm. Preserving the survivability of spermatozoons in dilute sperm of boars is one of the pressing problems of reproductive biotechnology.

The article presents the results of studying the sensitivity of bacteria isolated from the sperm of boars to the antibiotics of various pharmacological groups, as well as the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics for *Pseudomonas aeruginosa*. According to the obtained data, the microorganisms-contaminants of the sperm of boars were most sensitive to enrofloxacin, gentamicin, streptomycin, colistin, spectinomycin, sulfadiazine. By the level of bacteriostatic activity of antibiotics, *Pseudomonas aeruginosa* was the most sensitive to enrofloxacin (MIC = 0.75 µg / ml).

Enrofloxacin and gentamicin showed insignificant toxic effect on the spermatozoons of boars at concentrations of 800 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ in a sperm diluent based on a glucose-chelate-citrate-sulfate medium. At lower concentrations (600 $\mu\text{g} / \text{cm}^3$ and less) of both antibiotics, the absolute survival rate of sperm remained high.

Keywords: SPERM OF BOARS, SPERMATOZOON, SURVIVAL, ANTIBIOTICS, MICROORGANISM SENSITIVITY, MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION, SPERM DILUENT.

ПОВЫШЕНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК РАЗБАВИТЕЛЕЙ СПЕРМЫ ХРЯКОВ

Т. И. Стецко, Л. Л. Островская, И. Е. Атаманюк, Г. П. Угрын, О. И. Хомяк

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

Эффективность искусственного осеменения в значительной степени зависит от санитарного качества спермы производителей, сред и веществ, применяемых при разбавлении спермы. Сохранение жизнеспособности сперматозоидов в разбавленной сперме хряков является одной из актуальных проблем репродуктивной биотехнологии.

В статье приведены результаты изучения чувствительности бактерий-изолятов, выделенных из спермы хряков, к антибиотикам различных фармакологических групп, а также определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотиков для *Pseudomonas aeruginosa*. Согласно полученным данным, микроорганизмы-контаминанты спермы хряков наиболее чувствительными были к энрофлоксацину, гентамицину, стрептомицину, колистину, спектиномицину, сульфадиазину. По уровню бактериостатического активности антибиотиков *Pseudomonas aeruginosa* оказалась наиболее чувствительной к энрофлоксацину (МПК = 0,75 мкг/мл).

Энрофлоксацин и гентамицин проявляли незначительное токсическое действие на спермиев хряков в концентрациях 800 мкг/см³ в разбавителе спермы на основе глюкозо-хелато-цитрат-сульфатной среды. При более низких концентрациях (600 мкг/см³ и меньше) обоих антибиотиков показатель абсолютного выживания сперматозоидов оставался на высоком уровне.

Ключевые слова: СПЕРМА ХРЯКОВ, СПЕРМИИ, ВЫЖИВАНИЕ, АНТИБИОТИКИ, ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, МИНИМАЛЬНАЯ ПОДАВЛЯЮЩАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ, РАЗБАВИТЕЛЬ СПЕРМЫ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Інструкція із штучного осіменіння свиней: Відповідальний за випуск Ю. Ф. Мельник. – К. : Аграрна наука, 2003. – 56 с.
2. Михайлов Н. Н., Чистяков И. Я. Роль условно-патогенной микрофлоры в этиологии нарушения репродуктивной функции у животных. Матер. конф. по профилактике бесплодия сельскохозяйственных животных на Северном Кавказе. – Новочеркасск, 1974. – С. 35–38.
3. Балашов Н. Г. Ветеринарный контроль препаратов искусственного осеменения животных. – М.: Колос, 1980. –146 с.
4. Пантюхова О. И. Влияние микроорганизмов и бактериологических веществ на

переживаемость и оплодотворяющую способность спермиев. Киев, 1986. – 213 с.

5. Підвищення ефективності штучного осіменіння корів та свиноматок шляхом застосування декаметоксину для санації сперми плідників / Музика В. П., Атаманюк І. Є., Панич О. П., Чайковська О. І. // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок – 2013. – Вип. 14. – № 3,4. – С. 86-92.

6. Косенко М. В., Музика В. П., Атаманюк І. Є., Панич О. П., Чайковська О. І. Препарат для санації сперми кнурів «ГЕНТАДЕКС». – Патент на корисну модель № 41768 2009 р.

7. Плишко Н. Т. Способ продления жизни и оплодотворяющей способности половых клеток хряка // Свиноводство. – 1965. – № 6. – С. 37–41.

8. Плишко Н. Технологии и препараты для повышения воспроизводства животных [Текст] / Н. Плишко. – Бровары, 2005. – 112 с.

9. Гуревич Л. В., Шнур В. И., Гречухина А. Н. К вопросу о санации спермы хряков на станции искусственного осеменения свиней // Бюллетень ВНИИ разведения и генетики с.х. животных. – 1982. – Вып. 60. – С. 40.

10. Осетров А. М. Новиков В. В. Профилактика микробного загрязнения спермы хрякав // Свиноводство. – 1983. – № 2. – С. 19–20.

11. Методичні вказівки по визначенню чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів методом дифузії в агар за допомогою стандартних дисків з антибіотиками. – Львів, 2010. – 12 с.

12. M31-S1 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. – Vol. 24 – No. 17.

13. Методичні вказівки по визначенню бактеріостатичної та бактерицидної концентрації антибактеріальних препаратів методом серійних розведень – Київ, 2007. – 6 с.

Рецензент – І. М. Кушнір, д. вет. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.