

УДК 636.4: 591.16: 612.616: 577.18

С. В. ГОРЧИН, аспірант,

М. М. ШАРАН, доктор сільськогосподарських наук

С. Б. КОРНЯТ, кандидат сільськогосподарських наук

Інститут біології тварин НААН України, м. Львів

ЯКІСТЬ СПЕРМИ КНУРІВ ЗА ІНКУБАЦІЇ IN VITRO ПРИ ВИКОРИСТАННІ КОМБІНАЦІЙ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ У СКЛАДІ РОЗРІДЖУВАЧА

Наведено результати досліджень щодо впливу різних комбінацій антибактеріальних препаратів у складі розріджувачів на якісні показники сперми кнурів. Встановлено найвищу активність спермій кнурів при використанні наступної комбінації антибіотиків (мг/100 мл розріджувача): ампіцилін – 30, гентаміцин – 20, енрофлоксацин – 20. У 3, 4 і 5-й дослідних зразках сперми ступінь аглютинації сперми був найнижчий впродовж інкубування: з четвертої по шосту добу, що свідчить про високу якість розбавленої вказаними середовищами сперми кнурів. Вірогідне зниження водневого показника сперми кнурів породи дюрок 3, 4 і 5-ї дослідних проб починалося пізніше ніж в інших дослідних зразках і контролі (лише з шостої доби), що вказує на інгібування метаболічних процесів у сперміях і продовження їх життєдіяльності.

Ключові слова: сперма, спермії, кнурі, антибіотики, активність, аглютинація, рН.

Штучне осіменіння у свинарстві є основним методом відтворення тварин, а також селекційно-племінної роботи. В умовах виробництва у більшості випадків не вдається отримати сперму від кнурів без мікроорганізмів, кількість яких протягом її зберігання зростає. Багато дослідників вивчають можливості зменшення впливу чинників, які погіршують біологічну цінність сперми, серед яких присутність мікрофлори відіграє ключову роль [1, 2].

Висока контамінація сперми умовно-патогенною мікрофлорою призводить до необхідності її санації антимікробними препаратами широкого спектру дії. Широке застосування антимікробних засобів викликало появу штамів мікроорганізмів з підвищеною стійкістю до їхньої дії, які значно знижують якісні показники сперми, що призводить до зниження заплідненості, абортів і безпліддя самок, народження мертвого та нежит-тездатного потомства тощо [3].

Основними вимогами до сануючих речовин (антибіотики, сульфаніламідів й хіміотерапевтичні препарати) є їх висока бактерицидна активність, здатність загальмовувати обмінні процеси у сперміях і, тим самим, підвищувати їх здатність до зберігання.

У попередніх експериментах нами досліджено мікробне забруднення сперми кнурів у різні сезони року, встановлено видовий склад мікрофлори, а також чутливість виділених мікроорганізмів до антибіотиків. Зокрема, мікрофлора сперми кнурів складається з асоціації мікроорганізмів, яка представлена кишковою і сінною паличками, дріжджеподібними грибами, коками, синьо гнійною паличкою та протеем. [4].

При вивченні чутливості мікроорганізмів до окремих антибактеріальних препаратів встановлено найефективніші антибіотики, які проявили наступні показники зони затримки росту мікрофлори сперми: енрофлоксацин – 22,6 мм, гентаміцин – 22,5 мм, левоміцетин – 22,0 мм, ампіцилін – 20,0 мм, окситетрациклін – 16,4 мм [5].

Це спонукало нас до дослідження ефективності використання різних комбінацій антибактеріальних препаратів у складі середовища для розрідження і зберігання сперми кнурів. При цьому враховували синергічні та антагоністичні властивості різних груп антибіотиків.

Тому **метою** дослідження в даній роботі було вивчення якості сперми кнурів впродовж її інкубування *in vitro* за використання середовища «Екосперм» з різним складом вказаних антибактеріальних препаратів.

Таблиця 1

Склад та дози антибактеріальних препаратів

Проби сперми	Склад антибіотиків	Дози антибіотиків (на 100 мл розріджувача), мг
1 дослідна (1 Д)	ампіцилін гентаміцин енрофлоксацин	10,0 10,0 10,0
2 дослідна (2 Д)	ампіцилін гентаміцин енрофлоксацин	20,0 20,0 20,0
3 дослідна (3 Д)	ампіцилін гентаміцин енрофлоксацин	30,0 30,0 30,0
4 дослідна (4 Д)	ампіцилін гентаміцин енрофлоксацин	30,0 20,0 20,0
5 дослідна (5 Д)	ампіцилін енрофлоксацин	30,0 30,0
6 дослідна (6 Д)	окситетрациклін левоміцетин	30,0 30,0
7 дослідна (7 Д)	левоміцетин енрофлоксацин	30,0 20,0
Контрольна (К)	ампіцилін бензилпеніцилін	25,0 50,0

Матеріал і методи. Дослідження проведені у Львівському НВЦ «Західплемресурси» та лабораторії фізіології і патології відтворення Інституту біології тварин НААН.

Об'єктом досліджень була сперма кнурів породи дюрок (n=3). Сперму відбирали мануально на чучело з режимом використання 2 рази на тиждень. В експерименті використали 9 еякулятів .

Після отримання визначали об'єм, концентрацію сперміїв в еякуляті, після чого сперму транспортували у клімабоксі при температурі +17°C. З кожного еякуляту було сформовано 8 груп. Сперму всіх груп розріджували середовищем «Екосперм» [6] з різним складом антибактеріальних препаратів (табл. 1).

Після розрідження сперму кнурів інкубували *in vitro* за температури +17–18°C впродовж 7 діб. Щоденно визначали активність і виживаність спермій, наявність аглютинації.

Активність сперми визначали за температури 40° С з допомогою інвертованого мікроскопа Биолам П-1 («Ломо», Росія) при збільшенні в 150 разів у кількох полях зору у 2-3 краплях сперми, які наносили на предметне скельце. У 1-у, 3-ю і 5-у добу визначали водневий показник (рН) сперми з використанням рН-метра 340 [7].

Статистичну обробку даних здійснювали при допомозі пакету програми Statistica 7 (StatSoft, США).

Результати та обговорення. Аналізом активності спермій кнурів встановлено суттєві зміни її впродовж інкубування *in vitro*, при цьому спостерігали відмінності між пробами сперми. Так, впродовж інкубування сперми кнурів спостерігалася поступове зниження активності спермій, проте різниця між пробами була значною (табл. 2). Зокрема, у 1-ій дослідній пробі, де сумарна кількість антибіотиків становила 30 мг/100 мл середовища, добове зниження активності спермій було стрімким – 12,0-20,0 % до третьої доби і 12,5-20,0 % до шостої доби інкубування, що зробило сперму непридатною для використання після третьої доби, коли активність була меншою 50,0 %.

Таблиця 2

Активність спермій кнурів за інкубування при +17°C, %, n=9

Проби сперми	Доба інкубування сперми <i>in vitro</i>							P
	1	2	3	4	5	6	7	
1 Д	90,0	70,0	58,0	40,	20,0	7,5	0	<0,05
2 Д	92,5	75,5	65,0	52,5	38,0	18,5	10,0	<0,05
3 Д	92,5	85,5	85,0	77,5	55,3	27,5	15,0	<0,05
4 Д	90,0	87,5	86,0	80,0	60,0	29,7	15,0	<0,01
5 Д	90,0	87,5	85,5	77,0	52,5	26,0	15,0	<0,05
6 Д	92,5	78,0	70,0	60,5	42,5	19,0	10,0	<0,05
7 Д	92,5	82,7	75,0	67,5	46,5	20,0	10,0	<0,05
К	90,0	77,5	72,5	63,7	45,0	17,5	10,0	<0,01

Дещо вищу активність спермій впродовж інкубування спостерігали у 2 і 6-ій дослідних пробах, де вона знижувалася до четвертої доби відповідно щодня на 10,5-17,0 % та 8,0-14,5 % і на четверту добу становила 52,5 та 60,5 %, що свідчить про придатність сперми до використання її для штучного осіменіння свиноматок.

Активність спермій кнурів контрольної проби впродовж інкубування приблизно однакова з 7-ю дослідною пробію і на четверту добу становила, відповідно 63,7 і 67,5 % із щоденним зниженням активності, відповідно, на 5,0-12,5 % і 7,5-9,8 %. Починаючи з п'ятої доби інкубування активність спермій в обох пробах різко знижувалася (на 10,0-27,5 %), аналогічно як і у двох описаних вище пробах – 2 і 6-ій дослідних (на 8,5-23,5 %).

Найвищою зберігалася активність спермій впродовж усього періоду культивування *in vitro* у 3, 4 і 5-у дослідних зразках сперми, у яких використовували ампіцилін, гентаміцин та енрофлоксацин у середніх сумарних дозах (60-90 мг/100 мл середовища). Зокрема, у цих пробах сперми при культивуванні до четвертої доби зниження активності спермій було незначним – лише 0,5-8,5 %. На

п'яту добу інкубування активність сперміїв у вказаних зразках знижувалася суттєво – на 20,0-24,5 %, проте якість сперми залишалася високою (52,5-60,0 % активних сперміїв), що дозволило використовувати цю сперму для осіменіння свиноматок. Після п'ятої доби інкубування активність сперміїв стрімко знижувалася (на 11,0-27,8 %) і на сьому добу становила 15,0 %.

Таким чином, підсумовуючи отримані дані, слід відзначити, що застосування комбінацій ампіциліну, гентаміцину та енрофлораксацину у середніх дозах (20-30 мг/100 мл середовища) забезпечують високу активність сперміїв кнурів (понад 50,0 %) впродовж п'яти діб інкубування.

При оцінці якості сперми важливе значення має наявність чи відсутність аглютинації сперміїв. Аглютинація перешкоджає прямолінійно-поступальному руху сперміїв із-за їх склеювання.

Таблиця 3

Аглютинація сперміїв кнурів впродовж інкубування *in vitro*, n=9

Проби сперми	Доба інкубування сперми <i>in vitro</i>						
	1	2	3	4	5	6	7
1 Д		+	+	++	++	+++	
2 Д				+	++	+++	+++
3 Д				+	+	+	++
4 Д				+	+	+	++
5 Д				+	+	+	++
6 Д				+	++	+++	+++
7 Д				+	+	++	++
К				+	+	++	++

У нашому експерименті найменший ступінь аглютинації сперміїв – слабкий (+) – спостерігали з четвертої доби інкубування у всіх пробах, за винятком 1-ої дослідної, де слабка аглютинація проявлялася вже з другої доби культивування (табл. 3).

Слід відзначити, що у 1-ій дослідній пробі аглютинація різко прогресувала – на четверту – п'яту добу вже спостерігали середній ступінь (++) , а на шосту добу була масова аглютинація.

У трьох пробах (3, 4 і 5-а дослідна) ступінь аглютинації був найнижчий впродовж інкубування: з четвертої по шосту добу слабка (+) і на сьому добу середня, що свідчить про високу якість сперми.

Отже, впродовж інкубування сперми кнурів найнижчий ступінь аглютинації (+) спостерігали у 3, 4 і 5-й дослідних пробах.

Аналізуючи рН сперми кнурів впродовж інкубування *in vitro*, слід відзначити певні закономірності. Щодо рН у всіх пробах сперми незначно зменшувалося, проте високий ступінь вірогідності у певні дні та за різних концентрацій антибактеріальних препаратів у складі середовища свідчать про вплив антибіотиків на запліднюючу здатність середовища. Зокрема, рН сперми кнурів породи дюрорк 1 і 6-ої дослідних та контрольної проб вірогідно знижувалося ($p < 0,05-0,001$) з третьої до шостої доби культивування, проте ступінь вірогідності у контрольних та 7-х дослідних зразках був найнижчим ($p < 0,05$) на третю та четверту доби (рис.).

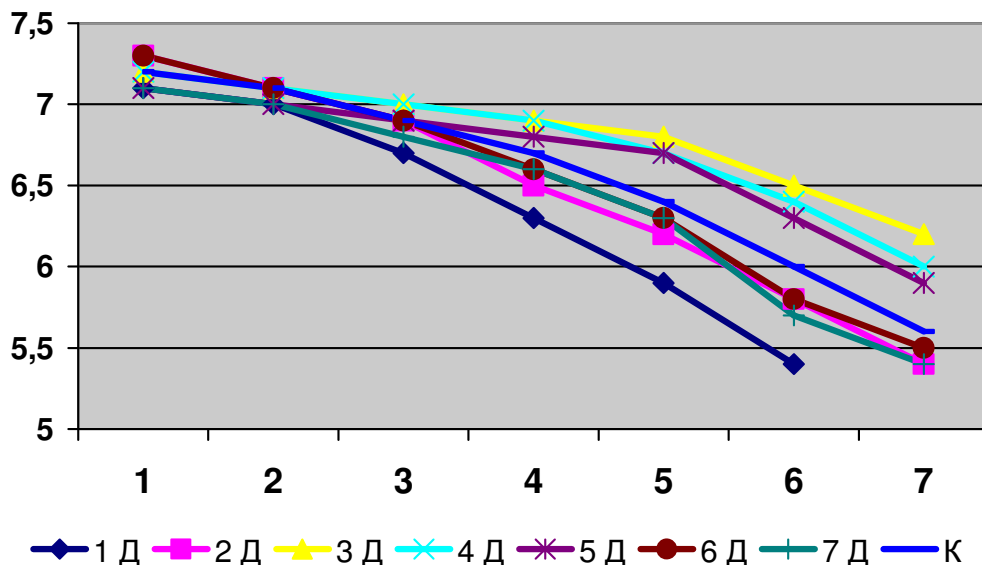


Рис. рН сперми кнурів впродовж інкубування *in vitro*

Вірогідне зниження водневого показника сперми кнурів породи дюрок 3, 4 і 5-ої проб починалося лише шостої доби, що вказує на інгібування метаболічних процесів у сперміях і продовження їх життєдіяльності.

Отже, з отриманих результатів видно, що найкраще зберігалася розбавлена середовищем «Екосперм» сперма кнурів у 3-, 4- та 5-му дослідних зразках, де були вибрані найбільш вдало поєднання та кількості антибіотиків, що може бути запропоновано для патентування нового середовища для розбавлення і зберігання сперми кнурів та до впровадження у виробництво.

Висновки

1. Найвищою активність сперміїв впродовж усього періоду культивування *in vitro* була в 3, 4 і 5-у дослідних зразках сперми, у яких використовували ампіцилін, гентаміцин та енрофлоксацин у середніх сумарних дозах (60-90 мг/100 мл середовища).

2. У 3, 4 і 5-й дослідних зразках сперми ступінь аглютинації сперми був найнижчий впродовж інкубування: з четвертої по шосту добу, що свідчить про високу якість розбавленої вказаними середовищами сперми кнурів.

3. Вірогідне зниження водневого показника сперми кнурів породи дюрок 3, 4 і 5-ої дослідних проб починалося пізніше ніж в інших дослідних зразках і контролі (лише з шостої доби), що вказує на інгібування метаболічних процесів у сперміях і продовження їх життєдіяльності.

Список використаної літератури

1. Sone M. Investigation on the control of bacteria in boar semen. / M. Sone. Japanese-Journal-of-Animal-Reproduction.– 1990.– V.36 (5).– P. 23-29.
2. Althouse G. Bacteriospermia in extended porcine semen. / G. Althouse, C. Lu, G. Kristina – Theriogenology.– 2004.– V. 63. – P. 573-584.

3. *Fernandez A.* The preliminary evaluation of the lectin effect of *Escherichia coli* on spermatic agglutination./ A. Fernandez, E. Cruz, L. Lazo, C. Arredondo, A. Brito. *Revista-de-Salud-Animal.*– 2001.– V. 23(2).– P. 73-79.

4. *Щербаченко Д. Ю.* Применение препаратов «Ровабио™ ЕКСЕНС» И «ДАФС-25» для коррекции репродуктивной функции у свиноматок: автореф. дис. канд. ветер.наук. /Д. Ю. Щербаченко.– Саратов.–2006.– 20 с.

5. *Горчин С. В.* Мікробна контамінація сперми кнурів у різні пори року та чутливість до антибактеріальних препаратів / С. В.Горчин, М. М. Шаран // Наук.-тех.бюл. Інституту біології тварин УААН і ДНКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Львів. – 2012. – Випуск 13. – №1-2. – С.460–464.

6. *Корбецький А. Р., Шаран М. М., Корнят С. Б., Андрушко О. Б., Хома Л. Й., Балабан С. П., Скоковська Ж. В., Татомир З. В., Кузиль О. Є.* Середовище для розбавлення і зберігання сперми кнурів «Екосперм». Деклараційний патент від 31.07.2007 № u200708849, МПК А61D19/02(2007.01).

7. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник /В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.; за ред. В. В. Влізла. – Львів: СПОЛОМ, 2012. – С.539-540.

КАЧЕСТВО СПЕРМЫ ХРЯКОВ ПРИ ЕЁ ИНКУБАЦИИ IN VITRO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМБИНАЦИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В СОСТАВЕ РАЗБАВИТЕЛЯ / Горчин С. В., Шаран М. М. Корнят С. Б.

В статье приведены данные результатов исследований влияния разных комбинаций антибактериальных препаратов в составе разбавителя для хранения спермы хряков на её качественные показатели. Исследовали влияние разных доз и сочетаний в среде для разбавления и хранения спермы хряков таких антибиотиков как ампицилин, гентамицин, энрофлоксацин, левомицитин, окситетрациклин и бензилпенициллин. Получено наивысшую активность спермиев хряков при использовании следующей комбинации антибиотиков в мг/100 мл разбавителя: ампицилин – 30, гентамицин – 20, энрофлоксацин – 20 (4-я опытная группа). В 3-, 4-, и 5-й опытных группах, где использовались комбинации указанных антибиотиков в дозах соответственно ампициллин, гентамицин и энрофлоксацин в дозах 30 мг/100мл среды; в дозах 30, 20 и 20 мг/100мл среды, и комбюинация ампициллина, энрофлоксацина, окситетрациклина и левомицетина в количествах 30 мг/100 мл сред , также был наиболее низким уровень агглютинации в течении инкубирования с четвёртого по шестой дни, что свидетельствует о высоком качестве разбавленной таким способом спермы хряков. Достоверное снижение реакции среды в исследуемых образцах спермы хряков 3-, 4-, и 5-й исследуемых групп начиналось позже, чем в других опытных образцах и контрольном (начиная с шестого дня хранения), что указывает на ингибирование метаболических процессов в спермиях с сохранением их оплодотворяющей способности

Ключевые слова: сперма, спермии, хряки, антибиотики, активность, агглютинация, рН.

QUALITY OF BOAR SEMEN BY ITS INCUBATION IN VITRO USING A COMBINATION OF ANTIBACTERIAL PREPARATIONS IN THE DILUENT COMPOSITION / S. Gorcin, M. M. Sharan, S. B. Korniat

The paper presents the data of the effect of different combinations of antibiotics in the diluent for semen of boars on its quality indicators. Investigated the effects of different doses and combinations among the dilution and storage of boar semen antibiotics such as ampicillin, gentamicin, enrofloxacin, levomitsitin, oxytetracycline, and penicillin. Received the highest activity of boar semen using the following combination of antibiotics in mg/100 ml of diluent: ampicillin – 30, gentamicin – 20, enrofloxacin – 20 (4th test group). The 3 -, 4 -, and 5 experimental groups, which used a combination of these antibiotics in doses respectively ampicillin, gentamicin and enrofloxacin at doses of 30 mg/100ml environment, in doses of 30, 20 and 20 mg/100ml medium and ampicillin kombyuinatsiya, enrofloxacin, oxytetracycline and chloramphenicol in quantities of 30 mg/100 ml of media, as was the lowest level of agglutination during incubation, from the fourth to sixth days, which indicates the high quality way dilute boar semen. A significant decrease in the reaction medium in the samples boar semen 3 -, 4 -, and 5 of the groups began later than in the other test samples and control (from the sixth day of storage), which indicates that inhibition of metabolic processes in the preservation of their sperm fertility.

Keywords: sperm, semen, boars, antibiotics, activity, agglutination pH.

Рецензент– головний науковий співробітник лабораторії молекулярної біології і клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН, доктор сільськогосподарських наук **Д. Д. Остапів.**