

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ЧИННИКІВ З БІОТЕХНОЛОГІЧНОЮ ПРИДАТНІСТЮ СПЕРМИ ЖЕРЕБЦІВ ДО ОХОЛОДЖЕННЯ

У статті уперше представлено дані дослідження впливу абсолютної кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички та загальної бактеріальної забрудненості сперми жеребців-плідників на її фізіологічні показники, за якими визначається її біотехнологічна придатність. Уперше встановлено, що коефіцієнт кореляції кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички з виживаністю охолодженої сперми становить мінус 0,6 ($p < 0,01$), а з абсолютним показником виживаності мінус 0,57 ($p < 0,01$). Вплив загальної бактеріальної забрудненості сперми жеребців на показники охолодженої сперми є меншим і становить мінус 0,5 ($p < 0,01$) на виживаність та мінус 0,52 ($p < 0,01$) на абсолютний показник виживаності. Пропонується визначати абсолютну кількість колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички у спермі жеребців поряд із визначенням коли-титру та встановлювати максимально допустимий рівень бактеріальної забрудненості сперми жеребців у 5000 КУО/см³ за сумою колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички та загальної бактеріальної забрудненості.

Ключові слова: фізіологія та біотехнологія відтворення коней, кишкова паличка, загальна бактеріальна забрудненість, охолодження сперми, жеребці.

Постановка проблеми

Світовій науці добре відома проблема негативного впливу мікробіологічної контамінації сперми сільськогосподарських тварин на результативність її

заморожування та подальшого штучного осіменіння самиць. Проте досліджень впливу мікробіологічної складової на біотехнологічну придатність сперми жеребців української селекції до охолодження недостатньо. У діючих нормативних документах ГОСТ 23681-79 «Сперма жеребцов неразбавленная свежеполученная» чітко нормується максимально допустимий рівень загальної бактеріальної забрудненості сперми жеребців – не більше 5000 КУО/см³ еякуляту, та максимально допустимий рівень колі-титру – не більше 1:10 на см³ еякуляту. Проблемаю тут є те, що колі-титр не відображує абсолютну кількість колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички, оскільки за визначенням «колі-титр – це об'єм рідини у якому виявлено одну кишкову паличку», тому при однаковому показнику колі-титру кількість колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички у спермі жеребців може бути різною і сума цього показника з показником загальної бактеріальної забрудненості може перевищувати максимально допустимий рівень у 5000 КУО/см³.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

Існує безліч фізіологічних чинників, які впливають на показники біотехнологічної придатності сперми жеребців до охолодження та кріоконсервування: імуні- та цитогенетичні, ступень ушкодження мембран спермій у процесі біотехнологічної обробки еякулятів, порода, вік, загальний фізіологічний стан, тощо [2–3, 7]. Проте одними з перших в Україні досліджень, у яких зверталась увага на вплив мікробіологічної складової не тільки на ефективність кріоконсервування сперми коней, а також на результативність біотехнологічної роботи з охолодження сперми саме жеребців-плідників, були опубліковані нами у 2011 році; тоді ми звернули увагу на зростання загальної бактеріальної забрудненості сперми жеребців у процесі біотехнологічної обробки еякулятів від отримання до охолодження і кріоконсервування [8]. В інших дослідженнях показано негативний вплив мікробіологічної складової сперми жеребців у зв'язку зі штучним осіменінням кобил [6]. Є повідомлення про залежність біотехнологічної придатності сперми жеребців від рівня мікотоксинів у кормах, який сприяє підвищенню бактеріальної та мікроміцетної контамінації [4–5, 12].

У закордонних дослідженнях також більше уваги приділяється ефективності кріоконсервування сперми жеребців залежно від мікробіологічної складової та недостатньо досліджується саме охолоджена сперма [9–15]. На наш погляд, необхідно звернути увагу на розширення практичного застосування саме свіжеотриманої охолодженої сперми жеребців, адже вона володіє більшою запліднюючою здатністю порівняно з відталою спермою.

Мета, завдання та методика досліджень

Метою статті є встановлення впливу абсолютної кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички та загальної

бактеріальної забрудненості на показники біотехнологічної придатності сперми жеребців до охолодження. Дослідження проводилося в Україні на 69-ти жеребцях-плідниках 9-ти порід, які належали кінним заводам, племрепродукторам та кінно-спортивним клубам Харківської, Полтавської, Запорізької, Луганської, Київської, Житомирської, Дніпропетровської областей впродовж 10 років, починаючи з 2005 року. Отримання та охолодження сперми виконували за Харківською технологією (спермодози у вигляді шприц-тюб), [2]. У охолодженій спермі загальноприйнятими методами визначали виживаність спермій у холодильнику при 2–4°C та абсолютний показник виживаності в умовних одиницях [8]. Загальну бактеріальну забрудненість та абсолютну кількість бактерій групи кишкової палички у спермі жеребців визначали відповідно на середовищі МПА (Sigma, США), середовищах Буліра та Ендо (Sigma, США) з дотриманням вимог стерильності за методиками ДСТУ 3535-97 «Сперма бугаїв нативна» та ГОСТ 20909.2-75 «Сперма быков неразбавленная. Методы микробиологических исследований».

Статистичну обробку отриманих даних проводили загальноприйнятими методиками варіаційної статистики за Плохінським М. О. [1]. Кореляційно-дисперсійний аналіз виконували з використанням спеціалізованого пакету прикладних програм SPSS for Windows.

Результати досліджень

Для виконання поставленої мети було проведено порівняння фізіологічних показників біотехнологічної придатності сперми жеребців до охолодження різних порід з одночасним встановленням загальної бактеріальної забрудненості та абсолютної кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички (БГКП). При цьому використовувалася сперма із допустимим рівнем колі-титру 1:10.

Порівняльну біотехнологічну придатність сперми до охолодження у розрізі обстежених порід залежно від її мікробіологічних характеристик наведено у таблиці 1.

Таблиця 1. Порівняльна ефективність охолодження сперми жеребців-плідників залежно від мікробіологічних характеристик (M±m)

Порода (кількість голів)	Кількість еякулятів	Показники охолодженої сперми			
		виживаність спермій, годин	абсолютний показник виживаності, ум.од.	кількість бактеріальних КУО/см ³	кількість БГКП КУО/см ³
1	2	3	4	5	6
Українська верхова (7)	219	68,63 ±1,95	168,92 ±4,88	3013,63 ±105,74	885,68 ±95,95
Чистокровна верхова (8)	208	63,79 ±1,87	143,16 ±4,78***	2557,36 ±101,97**	22,30 ±0,55***
Ганновська (7)	149	66,74 ±2,01	163,70 ±5,90	2717,64 ±79,90*	629,93 ±87,13*

Закінчення таблиці 1

1	2	3	4	5	6
Тракененська (6)	201	46,75 ±1,86***	109,11 ±4,97***	10100,08 ±984,30***	1365,27 ±99,84***
Вестфальська (9)	189	82,33 ±1,42***	205,33 ±3,63***	718,11 ±49,50***	493,29 ±42,20***
Бельгійська (8)	255	70,52 ±1,70	179,61 ±4,92	8196,79 ±443,26***	898,67 ±80,54
Арабська (7)	210	49,88 ±1,59***	128,82 ±4,35***	6297,06 ±285,48***	428,56 ±23,96***
Орловська рисиста (9)	147	66,39 ±1,80	169,13 ±4,39	2322,15 ±77,80***	1372,96 ±136,84**
Російська (призова) рисиста (8)	98	49,55 ±2,51***	133,44 ±5,34***	3217,39 ±56,25	1544,04 ±144,92***

Примітка. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Аналіз отриманих даних таблиці 1 свідчить про те, що виживаність спермій у жеребців української верхової породи була у середньому на 4,84 години більше за чистокровну верхову породу, на 1,89 години більше за ганноверську породу, на 21,88 години більше ($p < 0,001$) за тракененську породу, на 13,7 години менше ($p < 0,001$) за вестфальську породу на 1,89 години менше за бельгійську породу, на 18,75 години більше ($p < 0,001$) за арабську породу, на 2,24 години більше за орловську рисисту породу та на 19,08 години більше ($p < 0,001$) за російську рисисту породу.

Абсолютний показник виживаності спермій у жеребців української верхової породи був у середньому на 25,76 умовних одиниць більше ($p < 0,001$) за чистокровну верхову породу, на 5,22 умовних одиниць більше за ганноверську породу, на 59,81 умовних одиниць більше ($p < 0,001$) за тракененську породу, на 36,41 умовних одиниць менше ($p < 0,001$) за вестфальську породу на 10,69 умовних одиниць менше за бельгійську породу, на 40,1 умовних одиниць більше ($p < 0,001$) за арабську породу, на 0,21 умовних одиниць менше за орловську рисисту породу та на 35,48 умовних одиниць більше ($p < 0,001$) за російську рисисту породу.

Така біотехнологічна придатність сперми жеребців обстежених порід до охолодження спостерігалася на фоні того, що загальна кількість бактерій у спермі жеребців української верхової породи була у середньому на 456,27 КУО/см³ більше ($p < 0,01$) за чистокровну верхову породу, на 295,99 КУО/см³ більше ($p < 0,05$) за ганноверську породу, на 7086,45 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за тракененську породу, на 2295,52 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за вестфальську породу на 5183,16 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за бельгійську породу, на 3283,43 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за арабську породу, на 691,48 КУО/см³ більше ($p < 0,001$) за орловську рисисту породу та на 203,76 КУО/см³ менше за російську рисисту породу.

Абсолютна кількість бактерій групи кишкової палички (БГКП) у спермі жеребців української верхової породи була у середньому на 863,38 КУО/см³ більше ($p < 0,001$) за чистокровну верхову породу, на 255,75 КУО/см³ більше ($p < 0,05$) за ганноверську породу, на 479,59 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за тракененську породу, на 392,39 КУО/см³ більше ($p < 0,001$) за вестфальську породу на 12,99 КУО/см³ менше за бельгійську породу, на 457,12 КУО/см³ більше ($p < 0,001$) за арабську породу, на 487,28 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за орловську рисисту породу та на 658,36 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за російську рисисту породу.

З вищевикладеного матеріалу, у першу чергу, виникає питання: чи є вплив абсолютної кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички та загальної бактеріальної забрудненості на біотехнологічну придатність сперми жеребців обстежених порід до охолодження?

Для з'ясування впливу досліджуваних мікробіологічних показників сперми жеребців на її біотехнологічну придатність до охолодження було проведено кореляційний аналіз отриманих даних.

Уперше встановлено, що коефіцієнт кореляції кількості кишкової палички становить:

- з виживаністю охолодженої сперми – мінус 0,6 ($p < 0,01$),
- з абсолютним показником виживаності – мінус 0,57 ($p < 0,01$).

В той же час загальна бактеріальна контамінація має дещо менший вплив на ефективність біотехнологічної роботи з охолодження сперми, оскільки має коефіцієнт кореляції:

- з виживаністю охолодженої сперми – мінус 0,5 ($p < 0,01$),
- з абсолютним показником виживаності – мінус 0,52 ($p < 0,01$).

Отже, при зростанні абсолютної кількості кишкової палички достовірно ($p < 0,01$) погіршується виживаність та абсолютний показник виживаності охолодженої сперми. При цьому абсолютна кількість колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички має більший вплив на сперму, ніж загальна бактеріальна забрудненість.

Висновки та перспективи подальших досліджень

Уперше доведено вірогідний вплив абсолютної кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички на біотехнологічну придатність сперми жеребців до охолодження за показниками виживаності та абсолютному показнику виживаності. Встановлено, що коефіцієнт кореляції кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички з виживаністю охолодженої сперми становить мінус 0,6 ($p < 0,01$), а з абсолютним показником виживаності – мінус 0,57 ($p < 0,01$). Вплив загальної бактеріальної забрудненості сперми жеребців на показники охолодженої сперми є меншим і становить мінус 0,5 ($p < 0,01$) на виживаність та

мінус 0,52 ($p < 0,01$) на абсолютний показник виживаності. Виходячі з вищевикладеного, пропонується: 1) визначати абсолютну кількість колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички у спермі жеребців поряд із визначенням колі-титру; 2) максимально допустимий рівень бактеріальної забрудненості сперми жеребців у 5000 КУО/см³ слід визначати за сумою колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички та загальної бактеріальної забрудненості.

Перспективою подальших досліджень є розробка способу підвищення запліднюваності кобил за абсолютною кількістю колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички.

Література

1. Плохинский Н. А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский. – М. : Колос, 1969. – 256 с.
2. Ткачѐв А. В. Эффективность искусственного осеменения лошадей в зависимости от степени повреждения мембран сперматозоидов / А. В. Ткачѐв // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10 (1). – С. 145–148.
3. Ткачѐв А. В. Влияние иммуногенетических факторов на эффективность искусственного осеменения и естественной случки лошадей на Украине / А. В. Ткачѐв // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10 (2). – С. 371–374.
4. Ткачѐв А. В. Гормональный фон жеребцов под влиянием максимально допустимых уровней микотоксинов корма в Украине / А. В. Ткачѐв // Вестн. НГАУ. – 2014. – № 4 (33). – С. 115–119.
5. Ткачѐв А. В. Влияние допустимых концентраций микотоксинов корма на резистентность и контаминацию спермы жеребцов-производителей в Украине / А. В. Ткачѐв // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2014. – № 3 (14). – С. 3–7.
6. Ткачѐв А. В. Эффективность искусственного осеменения кобыл в зависимости от схем санации жеребцов перед получением спермы / А. В. Ткачѐв // Вестн. НГАУ. – 2015. – № 4 (37). – С. 95–101.
7. Ткачѐв А. В. Цитогенетический статус жеребцов под влиянием допустимых уровней микотоксинов корма / А. В. Ткачѐв // Молекулярная и прикладная генетика. – 2015. – № 19. – С. 79–84.
8. Ткачов О. В. Бактеріальна забрудненість сперми жеребців-плідників на різних біотехнологічних етапах кріоконсервування / О. В. Ткачов, В. О. Калашников, О. Б. Сушко // Наук.-техн. бюл. Ін-ту твар-ва НААН. – Х., 2011. – № 104. – С. 208–212.
9. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions / P. J. Casey, J. C. Gravance, R. O. Davis [et al.] // Theriogenol. – 1997. – № 47. – P. 575–582.

-
10. Graham J. K. Cryopreservation of stallion semen and its relation to fertility / J. K. Graham // *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* – 1996. – № 12. – P. 119–130.
 11. Fertility prediction in stallions / M. Magistrini, M. Vidament, F. Clement, E. Palmer // *Anim. Reprod. Sci.* – 1996. – № 42. – P. 181–188.
 12. Filannino A. Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm / A. Filannino, T. Stout, B. M. Gadella // *Reproductive Biology and Endocrinology.* – 2011. – № 9. – P. 134–140.
 13. Katila T. In Vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review / T. Katila // *Acta vet. Scand.* – 2001. – № 42. – P. 199–217.
 14. López-Fernández C. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion / C. López-Fernández, F. Crespo, F. Arroyo // *Theriogenology.* – 2007. – № 68 (9). – P. 1240–1250.
 15. Mottershead J. Frozen semen preparation and use Part. 1 / J. Mottershead // *Canadian Morgan Magazine.* – 2000. – Nov/Dec. – P. 32–43.
-