

УДК: 636.13.082:579.64:591.463.1 (477)

Вплив фізіологічної кількості кишкової палички на ефективність кріоконсервування сперми жеребців**О.В.Ткачов, В.І.Шеремета***Національний університет біоресурсів і природокористування України (Київ, Україна)*
sasha_sashaola@mail.ru

Досліджено біологічний вплив абсолютної кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички та загальної кількості сапрофітних бактерій у спермі жеребців-плідників української селекції на її фізіологічні показники до та після кріоконсервування. Уперше встановлено, що коефіцієнт кореляції кількості бактерій групи кишкової палички у нативній спермі із рухливістю відталого сперми становить $-0,54$ ($p<0,01$), із виживаністю сперміїв при 37°C $-0,54$ ($p<0,01$). Загальна кількість сапрофітних бактерій у спермі мала значно менший вплив на біологічні показники розмороженої сперми, ніж кишкова паличка, коефіцієнт кореляції загальної кількості сапрофітних бактерій у спермі з рухливістю відталого сперми складав лише $-0,17$ ($p<0,01$), а з виживаністю сперміїв лише $-0,2$ ($p<0,01$). Отримані дані уперше свідчать про те, що різні обстежені породи української селекції мають різний максимально допустимий рівень кількості колонієутворюючих одиниць кишкової палички у спермі. Тому у спермі жеребців пропонується визначати не тільки коли-титр та загальну кількість сапрофітних бактерій, а також абсолютну кількість колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички.

Ключові слова: *фізіологічна бактеріальна контамінація, кишкова паличка, кріоконсервування, сперма, жеребці.*

Влияние физиологического количества кишечной палочки на эффективность крíoконсервирования спермы жеребцов**А.В.Ткачѳв, В.И.Шеремета**

Изучено биологическое воздействие абсолютного количества колониеобразующих единиц бактерий группы кишечной палочки и общего количества сапрофитных бактерий в сперме жеребцов-производителей украинской селекции на ее физиологические показатели до и после криоконсервирования. Впервые установлено, что коэффициент корреляции количества бактерий группы кишечной палочки в нативной сперме с подвижностью оттаянной спермы составляет $-0,54$ ($p<0,01$), с выживаемостью спермиев при 37°C $-0,54$ ($p<0,01$). Общее количество сапрофитных бактерий в сперме имело значительно меньшее влияние на биологические показатели размороженной спермы, чем кишечная палочка, коэффициент корреляции общего количества сапрофитных бактерий в сперме с подвижностью оттаянной спермы составлял только $-0,17$ ($p<0,01$), а с выживаемостью спермиев только $-0,2$ ($p<0,01$). Полученные данные впервые свидетельствуют о том, что различные обследованные породы украинской селекции имеют разный максимально допустимый уровень количества колониеобразующих единиц кишечной палочки в сперме. Поэтому в сперме жеребцов предлагается определять не только коли-титр и общее количество сапрофитных бактерий, а также абсолютное количество колониеобразующих единиц бактерий группы кишечной палочки.

Ключевые слова: *физиологическая бактериальная контаминация, кишечная палочка, криоконсервирование, сперма, жеребцы.*

Impact of physiological amount of *E. coli* on the efficiency of stallion semen cryopreservation**A.V.Tkachev, V.I.Sheremeta**

The biological effect of the absolute number of colony forming units of coliform bacteria and the total number of saprophytic bacteria in the semen of the sires of Ukrainian selection on its physiological parameters before and after cryopreservation has been studied for the first time. It has been found out for the first time that the correlation coefficient of the number of coliform bacteria in the native semen with the thawed semen mobility is $-0,54$ ($p<0.01$), with the semen survival at 37°C $-0,54$ ($p<0,01$). The total number of saprophytic bacteria in the semen had significantly less impact on the biological indicators of the thawed semen than *E. coli* and the correlation coefficient of the total number of saprophytic bacteria in the semen with the mobility of the thawed semen was only -0.17 ($p<0.01$) and with the survival of semen only -0.2 ($p<0.01$). The data obtained have

proved for the first time that the examined breeds of the Ukrainian selection have different maximum permissible level of the number of colony forming units of *E. coli* in the semen. Therefore, not only the coli-titer and the total number of saprophytic bacteria but the absolute number of colony forming units of *E.coli* bacteria should be determined in the semen of stallions.

Key words: *physiological bacterial contamination, E. coli, cryopreservation, semen, stallions.*

Вступ

У світі відома проблема негативного впливу сапрофітної мікрофлори сперми тварин на ефективність її кріоконсервування, що в свою чергу впливає на результативність подальшого штучного осіменіння тварин (López-Fernández et al., 2007). Проте в Україні недостатньо досліджень, які б розкривали особливості біологічного впливу абсолютної кількості бактерій групи кишкової палички на ефективність кріоконсервування сперми жеребців української селекції. Діючи в Україні державні стандарти допускають у нативній спермі до 5000 КУО/см³ сапрофітних бактерій та колі-титр у мл сперми до 1:10. Ми звернули увагу на те, що колі-титр за визначенням не може відобразити реальну кількість кишкової палички, оскільки є «об'ємом сперми, у якому є кишкова паличка». При однаковому числовому показнику колі-титру кількість колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички може суттєво різнитися. Крім того, якщо сумувати абсолютну кількість кишкової палички та кількість сапрофітних бактерій, загальний рівень забрудненості може бути вище максимально допустимого рівня у 5000 КУО/см³.

Звісно, що крім бактерій існує багато інших біолого-фізіологічних чинників, які можуть впливати на ефективність кріоконсервування сперми жеребців: імуногенетичні характеристики, цитогенетичний профіль, цілісність мембран сперматозоїдів, породний чинник, віковий вплив, загальний фізіологічний стан тощо (Ткачів, 2013а, б; 2015а). Раніше ми звертали увагу науковців на можливість зростання сапрофітних бактерій у спермі жеребців від моменту її отримання до розморожування (Ткачів, 2015б). Існують повідомлення про негативний вплив сапрофітної мікрофлори сперми жеребців на результативність штучного осіменіння кобил (Casey et al., 1997; Mottershead, 2000). Цікавими біологічними дослідженнями є вплив допустимих концентрацій мікотоксинів у кормах для коней на зростання кількості сапрофітних бактерій та грибів (Ткачів, 2014а, б).

Західноєвропейські та американські дослідники приділяють велику увагу результативності кріоконсервування сперми коней залежно від біологічного впливу сапрофітів, проте не досліджують кількість бактерій групи кишкової палички (Filannino et al., 2011; Graham, 1996; Katila, 2001; Magistrini et al., 1996). На наш погляд, необхідно звернути увагу на біологічний вплив бактерій групи кишкової палички на результативність кріоконсервування сперми жеребців української селекції.

Метою роботи було встановлення впливу фізіологічної кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички та сапрофітних бактерій на основні фізіологічні показники сперми жеребців української селекції до та після кріоконсервування.

Об'єкти та методи дослідження

Дослідження виконували в Україні на 69 жеребцях-плідниках 9 порід, які належали кінним заводам, племрепродукторам та кінно-спортивним клубам Харківської, Полтавської, Запорізької, Луганської, Київської, Житомирської, Дніпропетровської областей впродовж 10 років (з 2005 року). Отримання та кріоконсервування сперми здійснювали за харківською технологією (спермодози у вигляді шприц-тюб) (Ткачов та ін., 2011). У розмороженій спермі жеребців загальноприйнятими методами визначали рухливість сперміїв після розморожування у балах (1 бал дорівнює 10% сперміїв з прямолінійним рухом), виживаність сперміїв у термостаті при 37°C у годинах (Ткачів, 2013б). Загальну кількість колонієутворюючих одиниць (КУО/см³) сапрофітних бактерій та абсолютну кількість бактерій групи кишкової палички у свіжеотриманій спермі коней визначали з використанням живильного середовища МПА (Sigma, США), а також живильних середовищ 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» (Ткачів, 2015б).

Статистичний аналіз отриманих результатів виконували загальноприйнятими методиками варіаційної статистики за М.О.Плохінським (Плохинский, 1969). Кореляційно-дисперсійний аналіз виконували з використанням спеціалізованого пакету прикладних програм SPSS for Windows.

Результати та обговорення

Для виконання поставленої мети було проведено порівняння фізіологічних показників розмороженої сперми жеребців різних порід української селекції з одночасним встановленням абсолютної кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички (БГКП) та загальної кількості сапрофітних бактерій. У дослідженні використовували сперму коней із допустимим рівнем колі-титру 1:10.

Порівняльна біотехнологічна придатність сперми до охолодження у обстежених порід залежно від її мікробіологічних характеристик наведена у таблиці.

Таблиця.

Порівняльна ефективність кріоконсервування сперми жеребців-плідників залежно від мікробіологічних характеристик ($M \pm m$)

Порода (кількість голів)	Кількість еякулятів	Показники розмороженої сперми			Контамінація нативної сперми	
		рухливість сперміїв, бали	виживаність сперміїв при 37°C, годин	еякуляти, що витримали заморожування, %	кількість бактеріальних КУО/см ³	кількість кишкової палички, КУО/см ³
Українська верхова (7)	219	3,41 ±0,07	3,35 ±0,07	74,89	2735,53 ±101,49	875,90 ±95,39
Чистокровна верхова (8)	208	3,28 ±0,05	3,42 ±0,05	80,30	2512,72 ±99,79	18,32 ±0,53***
Ганноверська (7)	149	3,42 ±0,07	3,89 ±0,09***	81,21	2680,44 ±79,67	609,77 ±85,42*
Тракененська (6)	201	2,93 ±0,05***	2,50 ±0,07***	50,75	8485,77 ±822,98***	1351,78 ±99,21***
Вестфальська (9)	189	3,76 ±0,11**	4,24 ±0,13***	81,48	712,34 ±49,08***	483,55 ±41,57***
Бельгійська (8)	255	3,50 ±0,06	3,85 ±0,08***	79,22	7412,16 ±390,58***	885,27 ±79,53
Арабська (7)	210	3,61 ±0,17	2,42 ±0,10***	55,71	5968,67 ±267,61***	419,73 ±23,51***
Орловська рисиста (9)	147	2,20 ±0,11***	2,22 ±0,10***	67,35	2279,04 ±78,28***	1358,99 ±135,64**
Російська (призова) рисиста (8)	98	1,59 ±0,11***	1,73 ±0,12***	47,96	3179,29 ±56,39***	1480,26 ±138,37***

Примітка. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (порівняно до української верхової породи).

Аналіз даних таблиці демонструє цікаву біологічну міжпородну різницю жеребців за здатністю їх сперми витримувати кріоконсервування. Так, найменший відсоток еякулятів, що витримали заморожування, демонстрували обстежені жеребці російської рисистої породи, на 19,39% менше від орловських коней, на 7,75% – за арабську породу, на 31,26% – за бельгійську породу, на 33,52% – за вестфальську породу, на 2,79% – за тракененських жеребців, на 33,25% – за ганноверську породу, на 32,34% – за чистокровну верхову породу та на 26,93% менше за плідників української верхової породи. При цьому слід зазначити, що нативна сперма жеребців призової породи мала найбільшу кількість колонієутворюючих одиниць кишкової палички з обстежених нами 9 порід.

Найкращу середню біологічну рухливість розмороженої сперми демонстрували жеребці вестфальської породи, що було у середньому на 0,35 бала більше ($p < 0,01$) за українську верхову породу, на 0,48 бала ($p < 0,01$) – за чистокровну верхову породу, на 0,34 бала ($p < 0,01$) – за ганноверську породу, на 0,83 бала ($p < 0,001$) – за тракененську породу, на 0,26 бала – за бельгійську породу, на 0,15 бала за арабську породу, на 1,56 бала ($p < 0,001$) за орловську породу

та на 2,17 бала більше за російську рисисту породу. Встановлені дані чітко демонструють наявність біологічної різниці між породами за показниками розмороженої сперми.

Міжпородна біологічна різниця спостерігалась і за показниками виживаності сперми обстежених жеребців. Найкращу виживаність сперміїв при 37°C у термостаті після розморожування демонстрували жеребці вестфальської породи, що було у середньому на 0,89 години більше ($p < 0,01$) за жеребців української верхової породи, на 0,82 години ($p < 0,01$) – за чистокровну верхову породу, на 0,35 годин – за ганноверську породу, на 1,74 години ($p < 0,001$) – за тракененську породу, на 0,39 годин – за бельгійську породу, на 1,82 години ($p < 0,001$) – за арабську породу, на 2,02 години ($p < 0,001$) – за орловську рисисту породу та на 2,51 години більше ($p < 0,001$) за жеребців російської рисистої породи. Тобто виживаність сперміїв жеребців після розморожування має достовірні біологічні міжпородні відмінності.

Для встановлення наявності біологічного взаємозв'язку між показниками розмороженої сперми та фізіологічною кількістю бактерій кишкової палички було проведено кореляційний аналіз, який показав, що коефіцієнт кореляції кількості бактерій групи кишкової палички у нативній спермі становить:

- із рухливістю відталої сперми – мінус 0,54 ($p < 0,01$);
- із виживаністю сперміїв при 37°C – мінус 0,54 ($p < 0,01$).

Отримані дані підтверджують наявність певного взаємозв'язку між абсолютною фізіологічною кількістю бактерій групи кишкової палички і основними біологічними показниками розмороженої сперми.

Найкраща, тобто найменша кількість бактерій групи кишкової палички у нативній спермі була встановлена у обстежених жеребців чистокровної верхової породи, що у середньому на 857,58 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за українську верхову породу, на 591,45 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за ганноверську породу, на 1333,46 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за тракененську породу, на 465,23 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за вестфальську породу, на 866,95 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за бельгійську породу, на 401,41 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за арабську породу, на 1340,67 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за орловську породу та на 1461,94 КУО/см³ менше ($p < 0,001$) за російську рисисту породу. З отриманих даних можна припустити, що різні обстежені породи української селекції мають різний максимально допустимий рівень кількості КУО кишкової палички у спермі.

Цікавим із біологічної точки зору є те, що загальна кількість сапрофітних бактерій у спермі мала значно менший вплив на біологічні показники розмороженої сперми, ніж кишкова паличка, коефіцієнт кореляції складав з рухливістю відталої сперми лише мінус 0,17 ($p < 0,01$), а з виживаністю сперміїв лише мінус 0,2 ($p < 0,01$).

Отже, при зростанні абсолютної кількості кишкової палички достовірно ($p < 0,01$) погіршуються основні біологічні показники розмороженої сперми, такі як рухливість та виживаність сперміїв. При цьому абсолютна кількість колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички має суттєво більший біологічний вплив на показники сперми жеребців української селекції, ніж загальна бактеріальна забрудненість. Представлене дослідження свідчить, що для різних порід української селекції максимально допустимий фізіологічний рівень абсолютної кількості бактерій групи кишкової палички за колонієутворюючими одиницями у см³ еякулятів є різним.

Таким чином, уперше доведено вірогідний біологічний вплив абсолютної кількості колонієутворюючих одиниць бактерій групи кишкової палички на основні біологічні показники розмороженої сперми у жеребців української селекції. Встановлено, що коефіцієнт кореляції кількості бактерій групи кишкової палички у нативній спермі із рухливістю відталої сперми становить мінус 0,54 ($p < 0,01$), із виживаністю сперміїв при 37°C мінус 0,54 ($p < 0,01$). При цьому вплив загальної бактеріальної забрудненості сперми жеребців на показники розмороженої сперми є меншим і становить з рухливістю відталої сперми лише мінус 0,17 ($p < 0,01$), а з виживаністю сперміїв лише мінус 0,2 ($p < 0,01$).

Виходячи 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 кишкової палички та загальної кількості сапрофітних бактерій.

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

Список літератури

- Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников. – Москва: Колос, 1969. – 256с. /Plokhinskiy N.A. Rukovodstvo po biometrii dlya zootekhnikov. – Moskva: Kolos, 1969. – 256s./
- Ткачѳв А.В. Влияние иммуногенетических факторов на эффективность искусственного осеменения и естественной случки лошадей на Украине // *Фундаментальные исследования*. – 2013а. – №10 (2). – С. 371–374. /Tkachev A.V. Vliyaniye immunogeneticheskikh faktorov na effektivnost' iskusstvennogo osemneniya i yestestvennoy sluchki loshadey na Ukraine // *Fundamental'nyye issledovaniya*. – 2013a. – №10(2). – S. 371–374./
- Ткачѳв А.В. Эффективность искусственного осеменения лошадей в зависимости от степени повреждения мембран сперматозоидов // *Фундаментальные исследования*. – 2013б. – №10 (1). – С. 145–148. /Tkachev A.V. Effektivnost' iskustvennogo osemneniya loshadey v zavisimosti ot stepeni povrezhdeniya membran spermatozoidov // *Fundamental'nyye issledovaniya*. – 2013b. – №10(1). – S. 145–148./
- Ткачѳв А.В. Влияние допустимых концентраций микотоксинов корма на резистентность и контаминацию спермы жеребцов–производителей в Украине // *Животноводство и ветеринарная медицина*. – 2014а. – №3 (14). – С. 3–7. /Tkachev A.V. Vliyaniye dopustimykh kontsentratsiy mikotoksinov korma na rezistentnost' i kontaminatsiyu spermy zherebtsov–proizvoditeley v Ukraine // *Zhivotnovodstvo i veterinarnaya meditsina*. – 2014a. – №3(14). – S. 3–7./
- Ткачѳв А.В. Гормональный фон жеребцов под влиянием максимально допустимых уровней микотоксинов корма в Украине // *Вестник Новосибирского государственного аграрного университета*. – 2014б. – №4 (33). – С. 115–119. /Tkachev A.V. Gormonal'nyy fon zherebtsov pod vliyaniem maksimal'no dopustimykh urovney mikotoksinov korma v Ukraine // *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. – 2014b. – №4(33). – S. 115–119./
- Ткачѳв А.В. Цитогенетический статус жеребцов под влиянием допустимых уровней микотоксинов корма // *Молекулярная и прикладная генетика*. – 2015а. – №19. – С. 79–84. /Tkachev A.V. Tsitogeneticheskiy status zherebtsov pod vliyaniem dopustimykh urovney mikotoksinov korma // *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*. – 2015a. – №19. – S. 79–84./
- Ткачѳв А.В. Эффективность искусственного осеменения кобыл в зависимости от схем санации жеребцов перед получением спермы // *Вестник Новосибирского государственного аграрного университета*. – 2015б. – №4(37). – С. 95–101. /Tkachev A.V. Effektivnost' iskusstvennogo osemneniya kobyl v zavisimosti ot skhem sanatsii zherebtsov pered polucheniyem spermy // *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. – 2015b. – №4(37). – S. 95–101./
- Ткачов О.В., Калашников В.О., Сушко О.Б. Бактеріальна забрудненість сперми жеребців–плідників на різних біотехнологічних етапах кріоконсервування // *Науково–технічний бюлетень Інституту тваринництва НААН*. – Харків, 2011. – №104. – С.208–212. /Tkachev O.V., Kalashnikov V.O., Sushko O.B. Bakterial'na zabrudnenist' spermy zherebtsov–plidnykiv na riznykh biotekhnologichnykh etapakh kriokonservuvannya // *Naukovo–tekhnichnyy byuleten' Instytutu tvarynyystva NAAN*. – Kharkiv, 2011. – № 104. – S. 208–212./
- Casey P.J., Gravance J.C., Davis R.O. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions // *Theriogenology*. – 1997. – No 47. – P. 575–582.
- Graham J.K. Cryopreservation of stallion semen and its relation to fertility // *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* – 1996. – No 12. – P. 119–130.
- Magistrini M., Vidament M., Clement F. Fertility prediction in stallions // *Anim. Reprod. Sci.* – 1996. – No 42. – P. 181–188.
- Filannino A., Stout T., Gadella B.M. Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2011. – No 9. – P. 134–140.
- Katila T. In Vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review // *Acta vet. Scand.* – 2001. – No 42. – P. 199–217.
- López-Fernández C., Crespo F., Arroyo F. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion // *Theriogenology*. – 2007. – No 68(9). – P. 1240–1250.
- Mottershead J. Frozen semen preparation and use. Part 1. // *Canadian Morgan Magazine*. – 2000. – Nov/Dec. – P. 32–43.

Представлено: М.М.Шаран / Presented by: M.M.Sharan

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 03.10.2016