

KUIĻU SPERMAS BAKTERIĀLĀ PIESĀRŅOJUMA VĒRTĒJUMS ASSESSMENT OF BACTERIAL CONTAMINATION OF THE BOARS SEMEN

Mangale Māra¹, Jemeljanovs Aleksandrs², Konošonoka Ināra²

LLU Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija¹, LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts "Sigra"² maramangale@inbox.lv

Faculty of Veterinary Medicine LUA, Latvia¹, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sigra”² of LUA

ABSTRACT

During the period of time in 2005 from May to December 104 semen samples from 24 boar ejaculates were analysed. Semen volume and concentration was detected. Preputial flush, undiluted and extended semen samples were bacteriologically examined at the Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine „Sigra”. Research results showed that total bacteria count at preputial opening in neat and extended semen have the influence of the season ($p < 0.01$), and an agreement between the total number of bacteria in the preputium of the neat and extended semen was found out ($p < 0.01$). The following bacterias were determined: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiela spp.*, *Plesimonas spp.*, *Arizona spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus*, which were fixed in neat and extended semen of preputium.

KEY WORDS: boar, semen, bacteriospermia, season

IEVADS

Bakteriālā piesārņotība ir bieži novērojama kuiļu spermas iegūšanas procesā. Kuiļu turēšanā novietnēs ir atklāti daudzi bakteriālā piesārņojuma avoti, kas ir saistīti ar dzīvniekiem un apkārtējo vidi. Viens no kuiļu spermas bakteriālā piesārņojuma avotiem ir prepūcija atvere, caur kuru dzimumceļos var iekļūt mikroorganismi no ārējās vides un *diverticulum preaputiale* (aklais maiss), kurš kuilim prepūcija priekšējās daļas mugurējā sienā veido samērā plašu dobumu, uzkrājot prepūcija dziedzeru izdalījumus, urīna atliekas, veidojot labvēlīgu vidi baktēriju augšanai. Zinātnieki Dagnall et Jones (1985) uzskata šo divertikulu par galveno bakteriālo piesārņojuma avotu ejakulātā, kā rī baktēriju veids un skaits ejakulātā ir atkarīgs no šķidruma daudzuma prepūcijā, kā arī no kuiļu vecuma un turēšanas veida. Jauniem kuļiem, kurus neizmanto spermas iegūšanai, prepūcijā nav šķidruma, un to spermā baktēriju daudzums ir vismazākais.

Vairums piesārņotāju ir Enterobacteriaceae dzimtas gramnegatīvās baktērijas. Baktēriju koncentrācija, arī laiks un vide ir par iemeslu negatīvai ietekmei uz spermijiem un var samazināt kuiļa reproduktīvās spējas (Althouse et al. 2000).

Mūsu uzdevums bija noskaidrot Latvijā audzējamo dažādu šķirņu kuiļu prepūcija, natīvās un atšķaidītās spermas bakteriālo piesārņojumu un tā sezonālo ietekmi.

MATERIĀLS UN METODIKA

Pētījums veikts laikā no 2005. gada maija līdz decembrim. Izmantoti 24 Pjetrenas, Jorkšīras, Dāņu landrases, Igaņu landrases un Seghers hibrīdšķirnes kuļi vecumā no viena līdz četriem gadiem. Vienu reizi mēnesī iegūti ejakulātu paraugi, kuros noteikts ejakulāta apjoms un spermas koncentrācija. Prepūciju noskalojumi, natīvas un atšķaidītas spermas paraugi izmeklēti bakterioloģiski LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātnes zinātniskā institūta "Sigra" akreditētā mikrobioloģijas laboratorijā. Noņemtajiem paraugiem noteikts kopējais mezofīlo aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu skaits, izmantojot

agaru barotnes un koloniju skaitīšanas agaru (Difco BBL). Tālākai mikroorganismu identifikācijai lietotas dažādas Hisa cukura barotnes.

Uzsējumi inkubēti 37⁰ C temperatūrā 72 stundas, kontrolējot un analizējot izaugušās kolonijas ik pēc 24 stundām. Baktērijas līdz sugas līmenim noteiktas ar BBL Becton Dickinson firmas Crystal grampozitīvo un gramnegatīvo baktēriju identifikācijas sistēmu, kurā iekļauti vairāku substrātu fermentācijas, oksidācijas un hidrolīzes testi. Baktērijas identificētas, salīdzinot iegūtos reakciju rezultātus ar datu bāzē esošajiem.

Datu apstrādē izmantoti 104 atšķaidītas un neatšķaidītas kuiļu spermas, kā arī prepūciju noskalojumu paraugu bakterioloģisko izmeklējumu rezultāti (n=104). Noteikts kopējais baktēriju skaits un to veidi 1ml kuiļu prepūcija noskalojumos, neatšķaidītā un atšķaidītā spermā. Datu analīze veikta izmantojot Microsoft Excel, SPSS 14,0 programmas.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Pirmajā tabulā apkopoti kuiļu ejakulāta un spermas koncentrācijas vidējie rādītāji, minētas noteikto rādītāju minimālās un maksimālās robežas.

1. tabula/Table 1

Kuiļu ejakulāta un spermas koncentrācijas vidējie, minimālie un maksimālie rādītāji Mean, minimal and maximal parameters of boars semen ejaculate and concentration

Vecums/Age (gadi) (years)	Ejakulāta apjoms (ml)/Ejaculate volume (ml)			Spermas koncentrācija (mljrd/ml) Concentration of semen (billion/ml)		
	Vidēji ()	min	max	Vidēji ()	min	max
1	189 ± 20	100	300	0.6 ± 0.05	0.2	1.2
2	285 ± 20	110	471	0.4 ± 0.03	0.2	0.9
3	254 ± 17	173	350	0.5 ± 0.05	0.3	0.9
4	224 ± 13	180	348	0.4 ± 0.04	0.2	0.8

Veicot datu apstrādi, noskaidrojās, ka vienu gadu veciem kuiļiem ejakulāta apjoms bija vidēji 189 ± 20ml un svārstījās no 100 – 300ml. Divus gadus veciem kuiļiem attiecīgi 285 ± 20ml ar svārstībām no 110 līdz 471ml ejakulāta. Trīs gadus veciem kuiļiem vidējais ejakulāta apjoms bija 254 ± 17ml ar svārstībām 173 – 350ml visā pētījuma laikā. Četrus gadus veciem kuiļiem ejakulāta apjoma vidējie rādītāji attiecīgi 224 ± 13ml, svārstoties 180 -348ml robežās.

Spermas koncentrācijas rādītāji vienu gadu veciem kuiļiem vidēji bija 0.6±0.05mljrd/ml ar svārstībām no 0.2 līdz 1.2 mljrd/ml. Divus gadus veciem kuiļiem vidējā spermas koncentrācija sasniedza 0.4 ± 0.03mljrd/ml līmeni ar svārstībām no 0.2 – 0.9mljrd/ml. Trīs gadus veciem attiecīgi 0.5 ± 0.05mljrd/ml ar spermas koncentrācijas svārstībām 0.3–0.9mljrd/ml. Spermas koncentrācijas vidējie rādītāji četrus gadus veciem kuiļiem bija 0.4 ± 0.04mljrd/ml ar svārstībām 0.2 -0.8mljrd/ml. Korelāciju aprēķini norādīja, ka ejakulāta apjoms (r=-0.29, p<0.01) un koncentrācija (r=0.25, p<0.01) ir atkarīgi no katra kuiļa individuālajām īpašībām (2. tabula).

Par kuiļa vecuma ietekmi uz ejakulāta apjomu norāda vāja pozitīva korelācija (r=0.24, p<0.05), savukārt, spermas koncentrācija raksturojas ar negatīvu vāju korelāciju (r=-0.25, p<0.01).

Lielākais bakteriālais piesārņojums visā pētījuma laikā bija prepūcija noskalojumos, samazinoties neatšķaidītā un atšķaidītā spermā (10⁷, 10⁵, 10⁴ kvv ml⁻¹), kas sakrīt ar literatūrā minētajiem datiem. Prepūciju noskalojumos baktēriju kopskaits sasniedza 1.5x10⁵ – 20.9x10⁷kvv ml⁻¹, natīvā spermā - no 1000 līdz 6.1x10⁵kvv ml⁻¹, atšķaidītā spermā - no 600 līdz 1.92x10⁴kvv ml⁻¹.

Aprēķinu rezultātā, izmantojot Spearmen metodi (2. tabula), noskaidrojām, ka pastāv cieša korelācija starp kopējo baktēriju skaitu neatšķaidītā un atšķaidītā spermā ($r=0.73$, $p<0.01$). Vidēji cieša korelācija ($r=0.49$, $p<0.01$) bija starp kopējo baktēriju skaitu prepūcijā un atšķaidītā spermā.

2.tabula/Table2

Kuļļu spermas kvalitātes rādītāju salīdzinājums
Correlation and significance of boar semens quality data

Spearmen correlation (r) Significance (p)	Korelācijaskoef.(r)	Būtiskuma līm.(p)	Kuļlis Boar	Ejakulāta apjoms ejaculate volume	Spermas koncentrācija concentration	Total bacteria in neat (natīvā) semen	Total bacteria In.extended (atšķaidītā) semenn	Total bacteria in preputium
	r	p						
Ejakulāta apjoms (ml) Ejaculate volume (ml)	r	-0.29**						
	p	0.01						
Spermas_koncentrācija (mlj/ml) Concentration of semen	r	0.25*	-0.57**					
	p	0.01	0.01					
Baktēriju kopskaits natīvā spermā kvv/ml ⁻¹ Total bacteria in neat semen	r	-0.06	-0.01	-0.01				
	p	0.53	0.98	0.93				
Baktēriju kopskaits atšķaidītā spermā kvv/ml ⁻¹ Total bacteria in extended semen	r	0.10	-0.09	0.02	0.73**			
	p	0.30	0.39	0.82	0.01			
Baktēriju kopskaits prepūcijā kvv/ml ⁻¹ Total bacteria in preputium	r	0.08	-0.06	0.10	0.38**	0.49**		
	p	0.42	0.57	0.29	0.01	0.01		
Sezona Season	r	0.19	-0.14	0.19	0.38**	0.57**	0.66**	
	p	0.05	0.17	0.05	0.01	0.01	0.01	

** Korelācija pie būtiskuma līmeņa $p<0.01$ /Correlation is significant at the 0.01 level.

* Korelācija pie būtiskuma līmeņa $p<0.05$ /Correlation is significant at the 0.05 level.

Kopējais baktēriju skaits prepūcijā uzrādīja vidēji ciešu korelāciju ar kopējo baktēriju skaitu neatšķaidītā spermā ($r=0.38$, $p<0.01$). Iegūtie rezultāti pamatoti apstiprināja problēmas aktualitāti un tās risināšanas nepieciešamību, jo literatūrā minēts, ka sēkliniekos un sēklinieka piedēkļos, kur notiek spermiju veidošanās un uzkrāšanās, vide ir sterila (Sone et all.1982, A. Jemeljanovs 1991)

Mikroorganismu kopskaits natīvā spermā pavasara mēnešos svārstījās $1000 - 125 \times 10^4$ kvv/ml⁻¹ robežās, vasarā no 7000 līdz 267×10^4 kvv/ml⁻¹, bet rudens mēnešos attiecīgi $20000 - 610 \times 10^4$ kvv/ml⁻¹ intervālā. Līdzīgas mikroorganismu kopskaita attiecības bija arī atšķaidītā spermā; pavasarī mikroorganismu skaits bija $600 - 20 \times 10^4$ kvv/ml⁻¹, vasarā palielinājās no

1000 līdz 192×10^4 kvv/ml⁻¹ un rudenī sasniedza 10000 – 90×10^4 kvv/ml⁻¹ skaitu. Mikroorganismu kopskaitam prepūcijā novērojām tendenci palielināties vasaras (150×10^4 - 936×10^7 kvv/ml⁻¹) un rudens (2×10^7 – 2088×10^7 kvv/ml⁻¹) mēnešos. Izmantojot Mann-Whitney testu, noteicām sezonas ietekmi uz spermās kvalitāti.

Vidēji cieša korelācija norādīja uz kopējā baktēriju skaita izmaiņām prepūcijā ($r=0.57$, $p<0.01$), natīvā (0.38 , $p<0.01$) un atšķaidītā ($r=0.66$, $p<0.01$) spermā, saistībā ar sezonu. Tajā pat laikā kuilim ir vāja ietekme uz kopējo baktēriju skaitu natīvā un atšķaidītā spermā ($r=0.19$, $p<0.05$).

Izplatītākās baktērijas prepūcijā natīvā un atšķaidītā spermā pavasara, vasaras un rudens mēnešos bija *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*. Prepūcijā noteiktās *Pseudomonas aeruginosa* daudzums vasaras mēnešos un rudenī svārstījās no 219000 līdz 260000 kvv/ml⁻¹. Natīvā spermā pavasarī *Pseudomonas aeruginosa* daudzums svārstījās no 40-1200 kvv/ml⁻¹ un uzsējumos atšķaidītā spermā vairs netika konstatētas, bet vasaras mēnešos baktērijas daudzums natīvā spermā bija 60-8400 kvv/ml⁻¹ un saglabājās atšķaidītā spermā (70-5400 kvv/ml⁻¹). Arī rudens mēnešos situācija bija līdzīga natīvā (20-4400 kvv/ml⁻¹) un atšķaidītā (20-2100 kvv/ml⁻¹) spermā.

Pavasara mēnešos natīvā spermā izolētās baktērijas: *Klebsiela spp.* (100-1000 kvv/ml⁻¹), *Plesimonas spp.* (200-3000 kvv/ml⁻¹), *Staphylococcus spp.* (80-5500 kvv/ml⁻¹), kuras, lai arī mazākā daudzumā, tika atrastas arī atšķaidītā spermā: *Klebsiela spp.* (40 kvv/ml⁻¹), *Plesimonas spp.* (200-1000 kvv/ml⁻¹), *Staphylococcus spp.* (1-10 kvv/ml⁻¹). Natīvā spermā noteiktās baktērijas: *Arizona spp.*, *Klebsiella pneumonia*, *Hafnia alvei*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, atšķaidītā spermā netika atrastas.

Vasaras mēnešos izolētās baktērijas: *Arizona spp.* (60-1800 kvv/ml⁻¹), *Staphylococcus spp.* (20-18000 kvv/ml⁻¹) saglabājās arī atšķaidītā spermā: *Arizona spp.* (20 kvv/ml⁻¹), *Staphylococcus spp.* (20-100 kvv/ml⁻¹). Noteiktās baktērijas natīvā spermā: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxitoca*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus spp.*, atšķaidītā spermā vairs netika konstatētas.

Rudens sezonā natīvā spermā izolētie sekojoši mikroorganismi: *Enterobacter cloacae* (60-1200 kvv/ml⁻¹), *Escherichia coli* (20-600 kvv/ml⁻¹), *Citrobacter diversus* (20-1200 kvv/ml⁻¹), *Staphylococcus spp.* (20-6400 kvv/ml⁻¹), konstatēti arī atšķaidītā spermā: *Enterobacter cloacae* (20-580 kvv/ml⁻¹), *Escherichia coli* (20-140 kvv/ml⁻¹), *Citrobacter diversus* (20 kvv/ml⁻¹), *Staphylococcus spp.* (60 kvv/ml⁻¹). Natīvā spermā atrastās *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, baktērijas atšķaidītā vairs netika konstatētas.

Bakterioloģiski izmeklējot kuļļu spermās atšķaidītāju, vide bija sterila.

3 tabula/Table3

Šķirņu ietekme uz kopējo baktēriju skaitu atšķaidītā spermā (p-vērtība)

Influence of boars breed on total amount of bacteria in extended semen

Šķirne	PJ	IL50%NL50%	Y	SG	DL	IL75%NL25%
PJ						
IL50%NL50%	0.519					
Y	0.969	0.593				
SG	0.973	0.572	0.832			
DL	0.894	0.964	0.688	0.554		
IL75%NL25%	0.939	0.820	0.705	0.561	0.789	

DL -Dāņu landrace/ Danich landrace

IL- Igauņu landrase/Estonian landrace

NL- Norvēģu landrase/ Norwegian landrace

PJ- Pjetrenas/Pyetren

Y- Jorkšīra /Youkshire

SG - Seghers hibrīds/Seghers hybrid

Veicot kuiļu spermās bakterioloģisko izmeklējumu salīdzināšanu kuiļu šķirņu starpā ar Mann-Whitney testa palīdzību, konstatējām, ka šķirne būtiski neietekmē arī kopējo baktēriju skaitu prepūcijā un natīvā spermā (3. tabula).

SECINĀJUMI

1. Ejakulāta apjoms un spermās koncentrācija ir atkarīga no kuiļa individuālajām īpašībām. Palielinoties vecumam, ejakulāta apjoms palielinās, bet spermiju koncentrācija samazinās.
2. Pastāv būtiskas atšķirības starp mikroorganismu kopskaitu prepūcijā, natīvā un atšķaidītā kuiļa spermā, kur tie augstāku koncentrāciju sasniedz prepūcijā, samazinoties natīvā un atšķaidītā spermā. Mikroorganismu kopskaits prepūcijā, natīvā un atšķaidītā spermā nav atkarīgs no kuiļa šķirnes.
3. Prepūcija, natīvās un atšķaidītās spermās bakterioloģiskajos paraugos visbiežāk izolēti; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*. Sezona būtiski ietekmē kopējo mikroorganismu skaitu ar tendenci palielināties vasaras un rudens mēnešos.
4. Pavasara mēnešos natīvā spermā noteiktās *Pseudomonas aeruginosa* baktērijas skaitā no 40 līdz 1200 kvv/ml⁻¹, atšķaidītā spermā vairs netika konstatētas, bet rudens mēnešos, sasniedzot 20-4400 kvv/ml⁻¹ robežu, tās novēroja arī atšķaidītā spermā. Vasaras mēnešos natīvā spermā *Pseudomonas aeruginosa* skaitliski (60-8400 kvv/ml⁻¹) bija lielākā daudzumā, salīdzinājumā ar pavasara un rudens mēnešiem, saglabājoties tām atšķaidītā spermā.
5. Sezonu robežās virkne mikroorganismu (pavasārī - *Klebsiella spp.*, *Plesimonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, vasarā - *Arizona spp.*, *Staphylococcus spp.*, rudenī - *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus*, *Staphylococcus spp.*), lai arī mazākā daudzumā, tomēr saglabājas atšķaidītā kuiļu spermā.
6. Natīvā kuiļa spermā izolētie mikroorganismi; *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxitoca*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter froindii*, *Enterobacter spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus spp.*, atšķaidītā spermā vairs netika konstatēti.

LITERATŪRA

1. Althouse, G.C. C.E. Kuster, S.G. Clark u. R.M.Weisinger. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. Theriogenology 2000. 53, 1167-1176.
2. Dagnall, G.J.R u. J.E.T. Jones Bacterial contamination of boar semen Proceedings 5th congress of the International Society for Anim. Hygiene 1985. 1, 412-416.
3. Sone M., T. Kawarasaki, A. Ogasa u. T. Nakahara. Effects of bacteria-contaminated boar semen on the reproductive performance. Jpn. J. Anim. 1989. Reprod. 35, 159-164.
4. Sone M., K. Ohmura u. K. Bamba. Effects of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. 1982. Vet. Rec. 111, 11-14.
5. А. Емельянов. Оценка и отбор быков - производителей на устойчивость к болезням: 06.02.01 - разведение, селекция и воспроизводство сельскохозяйственных животных: дис. на соиск. учен. степ. д-ра с.- х. наук / М - во сел. хоз - ва Латвии, Латв. науч. - исслед. ин - т животноводства и ветеринарии. - Сигулда, 1990. - 343 с.: ил., табл. - Библиогр.: с. 296-343 (558 назв.). - Отпеч. с грифом "На правах рукописи". - Машинопись.