

СПОСОБИ ПРИГОТУВАННЯ СТЕРИЛЬНИХ РОЗРІДЖУВАЧІВ ДЛЯ СПЕРМИ БУГАЇВ

М. Т. ПЛІШКО, кандидат біологічних наук

Український науково-дослідний інститут розведення
і штучного осіменіння великої рогатої худоби

В. О. ПАСІЧНИК, О. О. БРУЄНКО

Дослідне господарство «Центральна станція штучного
осіменіння сільськогосподарських тварин»

За літературними даними та результатами практичних спостережень забрудненість сперми сільськогосподарських тварин мікробами і грибами призводить до різкого зниження виживаності (на 33% і більше) та запліднювальної здатності сперміїв. Внесена разом із спермою в статеві шляхи самок мікрофлора швидко розмножується, порушує процеси запліднення і спричинює ранню ембріональну смертність, тобто неплідність (В. І. Сафонов та ін., 1973; Г. В. Зверева та ін., 1976). Тому в останні роки поряд з широким впровадженням штучного осіменіння зросли вимоги до санітарної якості сперми. Діючі інструктивні настанови допускають до використання сперму, що не містить ні патогенних, ні умовно патогенних мікроорганізмів, а кількість непатогенних не більше 500 в 1 мл при негативному колі-титрі.

Зусилля вчених та спеціалістів станцій по штучному осіменінню спрямовані на запобігання мікробній забрудненості сперми на всіх етапах роботи з нею — від одержання до використання. З цією метою вдосконалюють штучні піхви, впроваджують чимало санітарних заходів та протимікробних засобів. Важливим у зниженні мікробної контамінації сперми бугаїв є асептичне приготування синтетичних середовищ. Проте при бактеріологічних дослідках в окремих компонентах і виготовлених з них синтетичних середовищ за антибіотиками та без них знаходять мікрофлору.

Метою наших дослідів було визначити джерело забруднення лактозо-гліцерино-жовткового середовища. При бактеріологічних дослідках встановлено, що лактоза в порошку різних розфасовок, в тому числі в скляних флаконах по 11,5 г, призначена для виготовлення синтетичних середовищ, забруднена мікрофлорою (від 520 до 1350 мікробних клітин на 1 г лактози).

А тому при розрідженні сперми таким середовищем відбувається її мікробна забрудненість. Внаслідок цього збільшується кількість вибракуваної сперми (при проведенні бактеріологічних досліджень) або ж тварин осіменятимуть забрудненою спермою.

Для профілактики інфікування сперми, джерелом якого є забруднена лактоза, слід проводити або ж ефективну стерилізацію синтетичних середовищ, або активну санацію за допомогою збільшення дозування існуючих чи впровадження нових антибактеріальних засобів.

Ще не зовсім вивчена роль умовно патогенних мікроорганізмів, проте більшість дослідників вважають, що вони негативно впливають на запліднювальну здатність сперміїв. Тому питання профілактики забрудненості сперми мікроорганізмами, про роль яких є різні дані (Моніко-Тіасецька-Серафін, 1974), набуває актуального значення.

Патогенні властивості мікрофлори, які добре вивчені, у забрудненій спермі не втрачаються і при тривалому зберіганні її в рідкому азоті (-196°), що сприяє нагромадженню таких мікроорганізмів і в посудинах Дьюара для сперми.

Мікрофлора, яка потрапила в сперму під час одержання та технологічної обробки, значно (на 33%) знижує її запліднювальну здатність (Сафонов та Глазунов, 1975).

Слід зазначити, що за допомогою існуючих методів санації сперми бугаїв не можна повністю знезаразити її і, крім того, деякі антибактеріальні засоби можуть негативно вплинути на виживаність сперміїв.

Для знезараження вуглеводів та лимоннокислого натрію рекомендують опромінювати їх бактерицидними лампами (ГОСТ 4746—69 та інші інструктивні документи). Однак і після знезараження лактози таким способом при бактеріологічних дослідженнях у ній знаходять значну кількість мікроорганізмів та грибів. Оскільки ультрафіолетові промені поглинаються речовинами, то можна припустити, що опромінюються тільки поверхневі шари препаратів, внаслідок чого ефективність цього заходу значно знижується.

Ми провели порівняльну перевірку декількох способів стерилізації водних розчинів лактози і у вигляді порошку з метою встановлення найбільш ефективного при відсутності негативного впливу на молекули лактози. Вплив способу стерилізації визначали за біологічними показниками, зокрема за виживаністю сперміїв у лактозо-гліцеринно-жовткових середовищах, виготовлених з лактози у зазначених формах.

Водні розчини лактози стерилізували
в автоклаві при тиску 0,2 і 0,75 ат по 30 хв та
в водяній бані протягом 15 хв.

Наважки лактози в порошку стерилізували опроміненням бактерицидними лампами. Поряд з цим вивчали антибактеріальну дію синтетичного середовища № 25.

Методика досліджень. В дослідях використовували нативну сперму бугаїв в трьох розведеннях (1 : 10; 1 : 100; 1 : 1000) та технологічно оброблену до заморожування сперму в двох розведеннях (1 : 10; 1 : 100). В мікробіологічних дослідях визначали загальну бактеріальну забрудненість на м'ясо-пептонному агарі з однопроцентним розчином глюкози; наявність та виділення кишкової палички:

по колі-титру (за Буліром) і
в середовищі Ендо, а також

виділення анаеробів (середовище Кітт — Тароцці) та наявність токсичних грибів.

Спочатку готували водний розчин лактози. Для цього бідистилювану воду кип'ятили протягом 30 хв у колбі з термостійкого скла, наливали необхідну кількість її у стерильний циліндр і переносили в іншу стерильну колбу (ГОСТ 1770—64) з наважкою лактози у вигляді порошку. Отвір колби з розчином лактози закривали стерильною ватно-марлевою пробкою. Підготовлені зразки розчину лактози стерилізували в двох автоклавах при тиску 0,2 та 0,75 ат по 30 хв.

Для стерилізації розчину лактози в водяній бані використовували емальовану кастрюлю, на дно якої поміщали втрое складену марлю. Рівень води в бані дещо вищий за рівень розчину лактози в колбі. Тривалість стерилізації в водяній бані — 15 хв з моменту закипання води в бані.

Лактозу у вигляді порошку стерилізували за допомогою опромінення бактерицидною лампою БУВ-15 у спеціальному боксі. На стіл клали листок прозорого скла, поверхню якого знезаражували 96-градусним етиловим спиртом за ГОСТом 5962—67. Після повного випаровування спирту на скло наносили лактозу і за допомогою стерильного предметного скла розподіляли тонким шаром (не більше 0,5 см). Після опромінення протягом години бактерицидну лампу вимикали, лактозу старанно перемішували і знову вмикали лампу на одну годину. Таким чином, на тонкий шар лактози ультрафіолетове проміння діяло дві години.

Оскільки в умовах держплемстанцій розчин лактози готують, заливаючи наважку лактози (порошку) гарячою (90—95°) перемішаною дистильованою водою, ми перевірили і такий спосіб.

Вивчаючи ефективність різних способів стерилізації лактози в розчині і в порошок, ми використали два зразки цього препарату, які містили 870 та 1350 мікробних тіл в перерахунку на 1 г лактози. Проби для бактеріологічного дослідження відбирали згідно з методичними вказівками (1969 р.). З дотриманням правил асептики наважку лактози (1 г) переносили в пробірку з 9 мл стерильного фізіологічного розчину (розведення 1:10) і робили висіви на живильні бактеріологічні середовища. Із живильних середовищ у дослідах використовували м'ясо-пептонний агар (МПА) з 1% глюкози, м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) з 1% глюкози та середовище Буліра. На МПА висівали по 0,3 мл в одну бактеріологічну чашку (на кожну пробу брали по три чашки), на МПБ — по дві краплі, на середовище Буліра — по 1 мл на пробірку досліджуваного матеріалу. Висіви на МПА витримували в термостаті при температурі 37° 48 год, висіви на середовище Буліра при 43° — 24 год, а висіви на МПБ при 37° — протягом 6 діб, після чого визначали наявність росту мікрофлори.

Ріст грибів, крім того, враховували після додаткової витримки бактеріологічних чашок при кімнатній температурі в затемненому місці протягом 8 діб. Вплив на виживаність сперміїв лактозо-глицерино-жовткових середовищ, виготовлених із стандартних розчи-

нів лактози, які стерилізували різними способами, вивчали на термі 19 бугаїв-плідників, активність якої становила 8 балів і більше при концентрації не менше 0,8 млрд. сперміїв в 1 мл. Розведення сперми середовищами здійснювали за принципом розділених еякулятів. Заморожували її на охолодженій стерильній фторопластовій пластині загальноприйнятим методом. Через 1—2 доби після заморожування сперму відтаювали в 2,9-процентному розчині цитрату натрію при температурі 38—40°. Активність сперміїв визначали під мікроскопом при температурі 40—42°, а потім проби сперми ставили в термостат при 38° для визначення виживаності сперміїв. Активність та виживаність сперміїв визначали за загальноприйнятими методиками.

Результати досліджень. Бактеріологічними дослідженнями встановлено, що у всіх випадках розчини лактози були стерильними, якщо їх стерилізували в автоклаві при 0,75 ат або кип'ятінням у водяній бані (табл. 1). Стерилізація в автоклаві при 0,2 ат не

загальна бактеріальна забрудненість лактози при різних способах стерилізації, мікробних тіл в 1 мл (1977 р.)

Лактоза	Спосіб стерилізації	Дати дослідження					
		27. 01	2. 02	4. 02	7. 02	8. 02	11. 02
5-процентний розчин	Автоклавування при тиску 0,2 ат	Суцільний ріст	5	5	—	93	140
5-процентний розчин	Автоклавування при тиску 0,75 ат	0	0	0	—	0	0
5-процентний розчин	Кип'ятіння в водяній бані	0	0	0	0	0	0
у вигляді порошку	Ультрафіолетове опромінення (БУВ—15)	Суцільний ріст	5	0	—	95	0
5-процентний розчин	Розчинення лактози в гарячій воді	15	14	10	—	40	87

забезпечувала повної стерильності розчинів. Розчинення лактози в гарячій (90—95°) воді також згубно не діяло на мікрофлору.

При стерилізації лактози в порошок за допомогою ультрафіолетового опромінення в трьох зразках (з шести в досліді) була виявлена мікрофлора, тобто ефективність такої стерилізації становила 50%.

Отже, найкраще стерилізувати лактозу в автоклаві при 0,75 ат та кип'ятінням у водяній бані.

Проте біологічні дослідження свідчать (табл. 2), що стерилізація розчинів в автоклаві при 0,75 ат та стерилізація лактози в порошок ультрафіолетовим промінням зумовлюють токсичність лактози, яка проявляється у зниженні активності сперміїв (відповідно 3,2 та 3,5 бала) при розведенні сперми ЛГЖ середовищами, виготовленими з цих зразків лактози. Стерилізація розчину лактози

кип'ятінням в водяній бані не погіршила якості лактози. Активність та виживаність сперміїв у середовищах, виготовлених з таких розчинів, були найбільш високими (4 бали і 8 год), за винятком зразків лактози, які стерилізували в автоклаві при 0,2 ат.

2. Біологічні показники сперми при різних способах стерилізації лактози ($M \pm m$)

Способи стерилізації	Активність сперміїв, бали	Виживаність сперміїв, год
Автоклавування при тиску 0,2 ат	4,15 ± 0,15	9,45 ± 0,53
Автоклавування при тиску 0,75 ат	3,20 ± 0,32	6,13 ± 0,80
Кип'ятіння в водяній бані	4,09 ± 0,26	8,02 ± 0,64
Ультрафіолетове опромінення (БУВ-15)	3,59 ± 0,28	7,48 ± 0,80
Розчинення лактози в гарячій воді	3,62 ± 0,28	7,28 ± 0,72

ня у водяній бані протягом 15 хв, а стерилізація лактози за допомогою ультрафіолетового проміння мало ефективна і викликає зміни якості лактози, що негативно відбивається на активності та виживаності сперміїв у лактозо-гліцеринно-жовтковому середовищі.

ДІЯ ВИСОКИХ ТЕМПЕРАТУР НА СПЕРМІЇ БУГАЇВ

І. В. СМІРНОВ, доктор біологічних наук

АФІФІ АБДЕЛЬ-ХАМІД ЕЛЬ-МЕНУФІ, аспірант

Українська сільськогосподарська академія

Останнім часом появилось чимало робіт, присвячених благотворному впливу відтаювання замороженої сперми при високих температурах (понад 40°) на активність сперміїв (І. В. Смирнов, А. Є. Бруенко, 1971; А. Д. Бугров, 1976, та ін.).

Оскільки при цьому спермії можуть гинути від перегрівання, важливо знати динаміку дії таких температур на їх активність. Для вивчення цього питання ми провели дослід у дослідному господарстві Українського науково-дослідного інституту розведення і штучного осіменіння великої рогатої худоби «Терезине» на спермі п'яти бугаїв чорно-рябої і сментальської порід. Після взяття і оцінки сперму розбавляли лактозо-гліцеринно-жовтковим середовищем. Половину кожного розбавленого еякуляту повільно охолоджували до температури 2—4° і витримували протягом 4 год (для адаптації), а потім заморожували у вигляді гранул на фторопластовій пластині при температурі —140°. Через добу кожну

гранулу розморожували в 1 мл теплої (40°) 2,9-процентного розчину цитрату натрію. З другої половини розбавленого еякуляту одразу ж після розбавлення сперму набирали в піпетку і без попереднього охолодження вносили по дві краплі у флакони, де змістилось по 1 мл цитрату натрію, при температурі 50, 60 і 70°.

Аналогічно обробляли сперму з першої половини еякуляту (замороженої і відталі). Через кожні 5 с з флаконів брали по одній краплі суміші сперми і визначали під мікроскопом активність сперміїв (див. таблицю).

При температурі 50° активність сперміїв знижувалась повільно. У незамороженій спермі при такій температурі через 60 с активність сперміїв знижувалась від 7,9 до 4,5 бала, а після заморожування — відповідно від 4,0 до 2,6 бала. При 60° уже через 15—20 с активність сперміїв була нижче 0,1 бала, а при 70° таке зниження відбувалось через 5—10 с.

Отже, при відтаванні гранул в розчинах температурою 50—70° повного розморожування гранул слід не допускати, а перенести флакони в водяну баню при температурі 35°, щоб запобігти перегріванню і загибелі сперміїв.

За даними наших спостережень, гранули повністю відтають при температурі 40° через 21 с, при 50° — через 16 с, а при 60 і 70°, якщо зразу ж перенести флакон у водяну баню з температурою 35° і моментально занурити гранули в розчин, — відповідно через 19 і 17 с. Ці цифри можуть бути орієнтиром для розморожування сперми при підвищених температурах. Привертає увагу те, що окремі спермії зберігають активність при високих температурах порівняно довго. Очевидно, в спермі наявні клітини, яким властива стійкість проти високих температур.

Активність сперміїв у 2,9-процентному розчині цитрату натрію при різних температурах, бали

Час після занурення гранул в розчин, с	Температура розчину					
	незаморожена сперма			сперма після розмороження		
	50°	60°	70°	50°	60°	70°
0	7,9	7,9	7,9	4,0	4,0	4,0
5	6,3	0,6	0,3	3,3	0,4	ПП
10	5,7	0,4	ПП	3,3	0,1	ПП
15	5,5	0,1	ПП	3,1	ПП	Н
20	5,4	ПП	Н	3,0	ПП	—
25	5,3	ПП	—	3,0	ПП	—
30	5,0	ПП	—	2,9	Н	—
35	4,9	ПП	—	2,9	—	—
40	4,6	ПП	—	2,7	—	—
45	4,5	ПП	—	2,6	—	—
50	4,5	Н	—	2,6	—	—
60	4,5	—	—	2,6	—	—

Примітка. ПП — поодинокі спермії з прямолінійним рухом; Н — нерухомі спермії.