

UDK: 619 : 591.463.1
Stručni rad

ISPITIVANJE AEROBNE MIKROFLORE U SPERMI BIKOVA

*Gordana Pavlović, D. Krnjaić, G. Jakovljević, M. Pavlović, Ljiljana Ribar **

Izvod: Ispitivani su uzorci native i zamrznute sperme bikova Holštajn Frizijske rase Centra za veštačko osemenjavanje. U nativej spermi bikova zastupljene su brojne vrste mikroorganizama. Od uslovno patogenih mikroorganizama izolovani su *Corynebacterium renale* i *Staphylococcus aureus*. Mikrobiološkom pretragom native sperme ustanovljena je značajna zastupljenost saprofitne mikroflore: *Bacillus* spp., *Proteus mirabilis*, koagulaza negativne stafilokoke, mikrokoke, *Aspergillus* spp., i dr.

U tehnološkom procesu obrade semena dodaju se kombinacije antibiotika širokog spektra delovanja. Mikrobiološkom analizom uzoraka zamrznute sperme utvrđena je isključivo saprofitna mikroflora, dok je značajno veći broj uzoraka bio mikrobiološki negativan.

Obzirom da antimikrobni efekat dodatih antibiotika putem razređivača, zavisi prevashodno od prisutnih mikroorganizama, jasno je zašto mikrobiološki pregled semena kao deo zdravstvene kontrole priplodnih bikova ima veliki značaj za uspeh u reprodukciji goveda.

Ključne reči: mikroorganizmi, mikrobiološki pregled, sperma

Uvod

Unapređenje proizvodnih osobina životinja predstavlja primarni zadatak savremenog stočarstva. Dobijanje, obrada nativeg semena, njegovo duboko zamrzavanje i veštačko osemenjavanje predstavljaju važne biotehničke metode koje su od izuzetnog značaja za savremenu stočarsku proizvodnju.

Pored kvaliteta semena koji podrazumeva citološki kvalitet osemenjivačke doze, fertilitet ispitivan u biološkom testu i mikrobiološku ispravnost, brojni egzogeni i endogeni faktori utiču na uspeh osemenjavanja.

U tehnološkom procesu dobijanja i obrade semena priplodnih bikova, pri manipulaciji sa spermom može doći do kontaminacije semena.

* Gordana Pavlović, DVM; Goran Jakovljević, DVM; Miodrag Pavlović, DVM, Ljiljana Ribar, spec. mikrobiolog; PKB INI Agroekonomik, Padinska Skela; Mr Dejan Krnjaić, Fakultet Veterinarske medicine, Beograd.

Brojne vrste mikroorganizama mogu biti prisutne u kontaminiranom semenu bikova, a stepen patogenosti se kreće od saprofitnih do uslovno patogenih vrsta, s tim što je važno napomenuti da između njih ne postoji stroga granica (Jovičin, Pupavac, 1988).

Uslovno patogene vrste mikroorganizama su: *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Saprofitne vrste mikroorganizama su: *Bacillus* sp, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium* sp., *Penicillium* sp., *Micrococcus luteus*., *Acinetobacter coalcoaceticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Kontaminirano seme je lošijeg kvaliteta, a prisutni mikroorganizmi mogu uticati na dužinu života spermatozoida i fertilitet semena, dok neki od njih mogu dovesti do zapaljenjskih promena na polnim organima bika.

Treba istaći značaj mikrobiološkog pregleda sperme u cilju preveniranja transpermalnih infekcija.

Cilj ispitivanja

Cilj ovog rada je ispitivanje aerobne mikroflore native i zamrznute sperme priplodnih bikova.

Materijal i metod rada

Ispitivani su nativni i zamrznuti uzorci sperme priplodnih bikova Centra za veštačko osemenjavanje. Dobijanje sperme vršeno je metodom veštačke vagine. U mikrobiološkoj dijagnostici korišćene su čvrste podloge: krvni agar, podloga po Mac Conkey-u, Sabouraud agar. Korišćenjem ovih podloga može se izolovati većina aerobnih mikroorganizama. Pored ispitivanja makroskopskih i mikroskopskih osobina uzročnika, determinacija je vršena putem standardnih mikrobioloških tehnika; oksidaza, katalaza testovi, testovi određivanja oksidativno-fermentativnih i biohemijskih osobina mikroorganizama, kao i testovi koji se mogu koristiti u cilju izolacije i determinacije mikroorganizama.

Ukupan broj aerobnih mikroorganizama u zamrznutom semenu bikova određen je metodom duboke inokulacije, a izračunavanje broja mikroorganizama u ml ispitivanog uzorka vršeno je na osnovu broja izraslih kolonija na agar hranljivoj podlozi posle inkubacije na 37°C u trajanju od 72 h (ISO/TR 8607 : 1991).

Rezultati i diskusija

Ispitano je 27 uzoraka native sperme priplodnih bikova iz Centra za veštačko osemenjavanje. Rezultati mikrobiološkog ispitivanja native sperme prikazani su u tabeli 1a.

Tab. 1a. Vrste izolovanih mikroorganizama iz nativne sperme bikova

| VRSTE MIKROORGANIZAMA | BROJ |
|---------------------------------|------|
| <i>Corynebacterium renale</i> | 2 |
| <i>Corynebacterium bovis</i> | 7 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 |
| Koagulaza negativne stafilokoke | 8 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 3 |
| <i>Bacillus</i> spp. | 6 |
| <i>Micrococcus</i> spp. | 9 |
| <i>Moraxela</i> spp. | 3 |
| <i>Aspergillus</i> spp. | 3 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 4 |

U izolovanoj mikroflori dominiraju saprofitne vrste mikroorganizama čije je prisustvo verovatno posledica kontaminacije tokom tehnološkog procesa dobijanja semena. Svi ovi mikroorganizmi se nalaze na predmetima koji se koriste u tehnološkom postupku, na samoj životinji (koža, sluzokože, prepucijelna vreća, distalni deo uretre) kao i u ambijentu u kome se izvodi tehnološki postupak.

Uslovno patogenu mikrofloru od izolovanih vrsta mikroorganizama čine *Corynebacterium renale* i *Staphylococcus aureus*.

Tab. 1b. Rezultati broja izolovanih vrsta mikroorganizama iz uzoraka nativnog semena

| Broj vrsta izolovanih mikroorganizama | Broj uzoraka sperme |
|---------------------------------------|---------------------|
| Sterilno | 1 |
| Jedna vrsta mikroorganizama | 2 |
| Dve vrste mikroorganizama | 8 |
| Tri i više vrsta mikroorganizama | 9 |

U tabeli 1b. signifikantna je veća zastupljenost uzoraka nativne sperme sa dve i više vrsta mikroorganizama.

Od 27 uzoraka nativne sperme bikova kriterijume za dalju obradu tj. razređivanje i zamrzavanje, u pogledu gustine i pokretljivosti zadovoljilo je 22 uzorka. U tehnološkom procesu dalje obrade semena korišćen je komercijalni razređivač "BIOCIPHOS +". U njegovom sastavu nalaze se sledeći antibiotici: Linkomicin-spectinomycin, gentamicin i tylosin.

Rezultati mikrobiološkog ispitivanja uzoraka zamrznute sperme prikazani su u tabeli 2a.

Tab. 2a. Vrste izolovanih mikroorganizama iz zamrznute sperme bikova

| VRSTE MIKROORGANIZAMA | BROJ |
|-------------------------|------|
| <i>Bacillus</i> spp. | 2 |
| <i>Micrococcus</i> spp. | 2 |
| <i>Penicillium</i> spp. | 2 |

U izolovanoj mikroflori zamrznute sperme dominiraju isključivo saprofitne vrste mikroorganizama.

Tab. 2b.

| Broj vrsta izolovanih mikroorganizama | Broj uzoraka sperme |
|---------------------------------------|---------------------|
| Sterilno | 18 |
| Jedna vrsta mikroorganizama | 2 |
| Dve vrste mikroorganizama | 2 |

U tabeli 2b. evidentna je izrazito veća zastupljenost mikrobiološki negativnih uzoraka zamrznute sperme bikova.

Laboratorijska ispitivanja semena obuhvatala su i određivanje ukupnog broja aerobnih mikroorganizama. Ustanovljeno je da se kod 22 pregledana uzorka zamrznutog semena broj mikroorganizama kreće od 10.000 do 170.000 po ml zamrznutog semena.

Zaključak

Mikroflora nativne sperme priplodnih bikova obuhvata veći broj vrsta bakterija i plesni. Pored uslovno patogenih mikroorganizama *Corynebacterium renale* i *Staphylococcus aureus* u nativnoj spermi bikova zastupljene su i saprofitne vrste mikroorganizama: *Bacillus* sp., *Proteus mirabilis*, koagulaza negativne stafilokoke, *Micrococcus* sp. i dr. Prisutna mikroflora često je posledica tehnoloških propusta pri dobijanju sperme i neadekvatne higijene životinje. Obzirom da je metodom veštačke vagine nemoguće izbeći kontaminaciju u tehnološkom procesu razređivanja dodaju se antibiotici širokog spektra delovanja. U procesu razređivanja sperme bikova korišćen je komercijalni razređivač "BIOCIPHOS +". Anti mikrobnii efekat bio je izuzetno dobar tako da je nakon razređivanja u zamrznutom semenu prisutna isključivo saprofitna mikroflora, a od 22 pregledana uzorka 18 je bilo mikrobiološki negativno.

Ukupan broj aerobnih mikroorganizama kreće se od 10.000 do 170.000 po ml zamrznutog semena priplodnih bikova, što odgovara dozvoljenim vrednostima (200.000/ml).

S obzirom da antimikrobni efekat zavisi prevashodno od prisutnih mikroorganizama, jasno je zašto mikrobiološki pregled semena, kao deo zdravstvene kontrole priplodnih bikova ima veliki značaj za uspeh u reprodukciji goveda.

Literatura

1. Vomer, I.: "Zdravstvena kontrola bikova u centrima za umjetno osemenjavanje", Vet. Glasnik, br. 4/1968.
2. Jovičin, M., Nemeš, Ž., Boboš, I., Jakovljević, G., Kašić, M.: "Steonost krava u zavisnosti od citološkog i mikrobiološkog kvaliteta zamrznutog semena bikova". Zbornik naučnih radova XI savetovanja agronoma i tehnologa, Aranđelovac 3 (1997), 329-339.
3. Subotin, L., Jakovljević, G., Jovičin, M., Tasić, S.: "Indeks veštačkog osemenjavanja krava kao jedan od važnijih parametara u oceni rezultata rada u reprodukciji". Zbornik naučnih radova XI Savetovanja agronoma i tehnologa, Aranđelovac 3, 339-347.
4. Sergej, A.: "Ispitivanje mikroflore sperme bikova", specijalistički rad, Institut za mikrobiologiju Veterinarskog fakulteta u Beogradu (1968).
5. Marković, B.: "Porodiljstvo domaćih životinja", Naučna knjiga, Beograd, 1993.
6. Miljković, V.: "Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje domaćih životinja", II izdanje, Beograd, 1987.

UDC: 619 : 591.463.1
Preliminary report

INVESTIGATION OF AEROBIC MICROFLORA IN BULLS SPERM

*Gordana Pavlović, D. Krnjaić, G. Jakovljević, M. Pavlović, Ljiljana Ribar **

Summary

Samples of native bulls sperm of Holstein - Friesian breed from Center for Artificial Insemination, were investigated. In bulls sperm numerous types of microorganisms are represented. Of conditionally pathogenic microorganisms *Corynebacterium renale* and *Staphylococcus aureus* were isolated. By microbiological investigation it was established the important representation of saprophytic microflora: *Bacillus* spp., *Proteus mirabilis*, coagulase of negative staphylococcus, micrococcus, *Aspergillus* spp., etc.

In technological process of seed treatment combinations of antibiotics of a large spectrum of influence are added.

Taking into consideration that antimicrobial effect depends, first of all, on present microorganisms, it is clear why microbiological examination of semen as a part of healthy control of breeding bulls has a great importance for the success in cattle reproduction.

Key words: microorganisms, microbiological examination, sperm.

* Gordana Pavlović, B. Sc., dvm., Goran Jakovljević, dvm., Miodrag Pavlović, dvm., Ljiljana Ribar, spec. microbiologist, Institute "PKB-INI_Agroeconomic", Belgrade - Padinska Skela, Yugoslavia; Dejan Krnjaić, M. Sc., Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Yugoslavia.