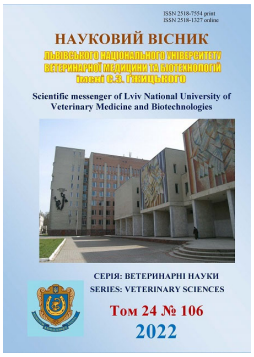

Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького. Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet10612
https://nvlvet.com.ua/index.php/journal

UDC 619:591.463.1:636.03:577.18

Modern technologies for storing semen of domestic animals without the addition of antibiotics

O. Tul✉, B. Kyrychko, T. Panasova

Poltava State Agrarian University, Poltava, Ukraine

Article info

Received 04.04.2022
Received in revised form 05.05.2022
Accepted 06.05.2022

Poltava State Agrarian University, 1/3, Skovorody Str., Poltava, 36003, Ukraine.
Tel.: +38-096-656-65-86
E-mail: oleksandratul@ukr.net

Tul, O., Kyrychko, B., & Panasova, T. (2022). Modern technologies for storing semen of domestic animals without the addition of antibiotics. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 24(106), 74–80. doi: 10.32718/nvlvet10612

Currently, there is a trend of breeding domestic animals through artificial insemination. As a result, very large amounts of sperm diluents containing antibiotics are used in animal husbandry. Antimicrobials are added to the semen diluent to control the growth of bacteria that contaminate the semen during selection. The proportion of antibiotic-resistant bacteria is steadily rising, threatening the entire health care system. That is why all fields of antibiotics application face the task of finding alternatives to this approach. The purpose of our study was to systematize modern technologies and methods of storing domestic animals' semen which could reduce or eliminate the use of antibiotics, and would be an important step in the fight against multidrug-resistant bacteria. Due to the negative impact of antibiotics on sperm quality and their fertilizing ability, new alternative methods for sperm storage are constantly being improved and developed. The most common are low-temperature storage, physical methods to reduce bacterial stress, the use of antimicrobial peptides, nanoparticles and the use of various substances of animal, plant or other origin. The possibility of boar sperm low-temperature storage may open up completely new approaches in the future by optimizing the cooling rate. Colloidal centrifugation as one of the physical methods is a practical means of reducing the bacterial load in sperm samples and it can be effectively used applying equipment that is available at many breeding plants. Antimicrobial peptides or nanoparticles of iron oxide may be a useful alternative to the addition of antibiotics during sperm storage. Antimicrobial peptides have been shown to control the growth of aerobic and anaerobic bacteria in relatively low concentrations without adversely affecting sperm quality and fertility. However, it is substantiated that nanoparticles with the size of 40 – 60 nm have significant antimicrobial ability against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. At the same time, further studies are needed on the use of various substances of animal or plant origin (royal jelly, aloe vera, algae extracts), as well as determining adequate concentrations of these new compounds that should be effective in fighting bacteria and not affect quality characteristics of sperm.

Key words: *alternative methods, antibiotics, bacteria, resistance, sperm storage, artificial insemination.*

Сучасні технології зберігання сперми свійських тварин без додавання антибіотиків

О. І. Туль✉, Б. П. Киричко, Т. Г. Панасова

Полтавський державний аграрний університет, м. Полтава, Україна

Нині спостерігається тенденція розведення свійських тварин за допомогою штучного запліднення. У зв'язку з цим у тваринництві використовуються дуже великі обсяги розріджувачів сперми, що містять антибіотики. Протимікробні препарати додаються в розріджувачі сперми для контролю за ростом бактерій, що забруднюють сперму під час відбору. Частка резистентних бактерій до антибіотиків неухильно зростає, і це є загрозою для всієї системи охорони здоров'я. Саме тому перед усіма сферами застосування антибіотиків стоїть завдання пошуку альтернатив цьому підходу. Метою наших досліджень було систематизація сучасних технологій та методів зберігання сперми свійських тварин, які могли б зменшити або виключити використання антибі-

отиків і стали б важливим кроком у боротьбі з полірезистентними бактеріями. Зважаючи на негативний вплив антибіотиків на якість сперміїв та їх запліднюючу здатність, постійно удосконалюються та створюються нові альтернативні методи для зберігання сперми. До найбільш поширених належать низькотемпературне зберігання, фізичні методи зниження бактеріального навантаження, застосування антимікробних пептидів, наночастинок та використання різних речовин тваринного, рослинного або іншого походження. Можливість низькотемпературного зберігання сперми кнурів може відкрити абсолютно нові підходи у майбутньому за допомогою оптимізації швидкості охолодження. Колоїдне центрифугування як один з фізичних методів є практичним засобом зниження бактеріального навантаження у зразках сперми і його можна ефективно застосовувати з використанням обладнання, яке наявне у багатьох племзаводах. Антимікробні пептиди або наночастинки оксиду заліза можуть стати корисною альтернативою додаванню антибіотиків при зберіганні сперми. Доведено, що антимікробні пептиди контролюють ріст аеробних та анаеробних бактерій у порівняно низьких концентраціях без шкідливого впливу на якість сперми та фертильність. Разом з тим обґрунтовано, що наночастинки розміром 40–60 нм мають значну антимікробну здатність щодо Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa і Staphylococcus aureus. Водночас необхідні подальші дослідження щодо застосування різних речовин тваринного або рослинного походження (маточне молочко, алое вера, екстракти водоростей), а також визначення адекватних концентрацій цих нових сполук, які мають бути ефективними при боротьбі з бактеріями та не впливати на якісні характеристики сперми.

***Ключові слова**: альтернативні методи, антибіотики, бактерії, резистентність, зберігання сперми, штучне осіменіння.*

Вступ

Резистентність до протимікробних препаратів є основною глобальною проблемою як у гуманній, так і у ветеринарній медицині. За експертними оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) – це є найбільшою загрозою для населення сучасного світу (Van Boeckel et al., 2019). Гени стійкості до протимікробних препаратів легко передаються між різними бактеріями (Duijkeren et al., 2005), тому навіть обмежене використання антибіотиків може призвести до розвитку значної резистентності (Catry et al., 2010). З цієї причини рекомендується обережне використання антибіотиків, тобто їх слід застосовувати лише у разі крайньої необхідності, з терапевтичними цілями та після перевірки бактерій на чутливість до запропонованого терапевтичного засобу.

Загалом нині існує тенденція до використання сильнодіючих антибіотиків широкого спектра дії у різних комбінаціях для зниження токсичності сперми свійських тварин. Однак ці протимікробні препарати можуть сприяти розвитку резистентності у людей, що працюють з розріджувачами сперми, а також впливати на живі організми під час утилізації невикористаних розріджувачів або доз сперми. Масштаби проблеми є очевидними, оскільки лише в Європі щорічно використовуються близько чотирьох мільйонів літрів розріджувача сперми кнура, що містить антибіотики (Morrell, 2011).

Однією з переваг штучного осіменіння є скорочення поширення інфекційних хвороб за рахунок запобігання контакту або транспортування тварин для розведення. Але водночас штучне осіменіння є одним із шляхів легкого поширення патогенних мікроорганізмів (Foote, 2002), тому самців перевіряють перед включенням в програму розведення і кілька разів протягом періоду одержання сперми. Заражена сперма або сперма інфікованих самців є джерелом потенційної передачі захворювань, сприйнятливих для самок.

Більшість еякулятів, одержаних від здорових сільськогосподарських тварин, певною мірою забруднені бактеріями (Wallgren, 1996; Malmgren et al., 1998; Smole et al., 2010). Подальше забруднення може виникати під час обробки сперми (Althouse, 2008), яка зазвичай відбувається без доступу до витяжки з ламінарним потоком повітря. Саме тому додавання антибіотиків у розріджувачі сперми регулюється урядовими директивами як на національному, так і на міжнародному рівні, в яких зазначені типи антибіотиків, що використовуються, а також їхня концентрація. Оскільки антибіотики можуть бути токсичними для сперміїв, в розріджувачах сперми використовується суміш агентів, щоб зменшити дію кожного окремого компонента. Дослідження науковців вказують, що гентаміцин, який широко застосовується в комерційних розріджувачах сперми, має негативний вплив на рухливість і життєздатність сперміїв (Aurich & Spergser, 2007). Однак є неофіційні відомості про те, що бактерії в деяких європейських країнах стійкі до передбачених антибіотиків, отже для боротьби з резистентними бактеріями використовуються додаткові антибіотики. Хоча багато країн намагаються скоротити загальне використання антибіотиків, щоб зменшити розвиток резистентності, все одно у більшості випадків спостерігається додавання антибіотиків до розріджувачів сперми, якого можна було б уникнути, поширюючи сучасні методики та технології зберігання сперми свійських тварин. Застосування антибіотиків в розріджувачах сперми викликають особливе занепокоєння у свинарстві та конярстві, де в основному використовують рідку сперму, а не заморожену (Morrell & Wallgren, 2014). Тому було б розумно максимально скоротити використання антибіотиків. Пошук альтернатив протимікробним препаратам для боротьби з мікроорганізмами в дозах сперми для штучного осіменіння є необхідним як для поліпшення якості та виживання сперми, так і для уповільнення розвитку стійкості до антибіотиків.

Результати та їх обговорення

Нині виокремлюють такі альтернативи використанню антибіотиків при зберіганні сперми: низькотемпературне зберігання, фізичні методи зниження бактеріального навантаження, антимікробні пептиди, наночастинки та використання різних речовин тваринного, рослинного або іншого походження.

Низькотемпературне зберігання сперми. Гіпотермічне зберігання (нижче ніж 10 °C) без антибіотиків може бути альтернативою для підтримки життєздатності сперміїв та контролю росту бактерій у розрідженій спермі кнура (Menezes et al., 2020; Schulze et al., 2022). Сперма кнура сприйнятливіша до холодового шоку порівняно зі спермами інших видів тварин (Maxwell &

Johnson, 1997; Casas & Althouse, 2013) за рахунок складу ліпідної мембрани (Schulze et al., 2015). Фазовий перехід ліпідів, що відбувається при температурі від 5 до 15 °C (Goldberg et al., 2013), може призвести до структурних змін, які спричиняють до порушення взаємодії ліпідів та білків, впливаючи на проникність мембрани (Schulze et al., 2015). Холодовий шок може бути пов'язаний із втратою іонів та ферментів, зниженням рухливості, зміною функції акросом (Schulze et al., 2015) та передчасною капацитацією, що впливає на запліднюючий потенціал сперміїв (Maxwell & Johnson, 1997; Casas & Althouse, 2013).

Незважаючи на неоптимальні умови, що стосуються температурної чутливості сперми кнурів, з'явилися перші повідомлення про успішне зберігання при низьких температурах (5–6 °C) за допомогою оптимізації швидкості охолодження (Waberski et al., 2019; Menezes et al., 2020; Paschoal et al., 2020; Jäkel et al., 2021). Проведені дослідження науковців вказують на те, що помірні швидкості охолодження допомагають захистити сперму кнура від пошкодження холодом, зберігаючи ліпідну структуру плазматичної мембрани (Casas & Althouse, 2013, Paschoal et al., 2020). В останніх дослідженнях, присвячених низькотемпературному зберіганню сперми кнурів, використовуються нові, адаптовані до низьких температур розріджувачі, що містять стабілізатори мембран та інгібітори капацитації, для підтримки якості сперми протягом більш тривалого часу навіть при низьких температурах (Estienne et al., 2007; Wasilewska & Fraser, 2017; Hensel et al., 2020; 2021).

Фізичні методи. Також альтернативою додавання протимікробних препаратів у розріджувачі сперми може бути видалення бактерій із сперми за допомогою фізичних методів, таких як центрифугування та фільтрація. Центрифугування через один шар колоїду щільністю 1,104 г/мл відокремлює сперміі від бактерій у спермі кнура відразу після збору сперми. Кількість бактерій знижувалась через кілька годин після відбору сперми (Morrell & Wallgren, 2011). Однак цей метод відділяє міцні сперміі з решти еякуляту (Morrell et al., 2009), отже частина популяції сперміїв втрачається. Зважаючи на втрату сперми під час застосування цього методу, а також високу вартість колоїду, все це призводить до відмови свинарів використовувати цей метод як альтернативу антибіотикам. Нещодавно науковцями було застосовано колоїд низької щільності (1,052 г/мл), який дозволяє видобувати більшу частину сперміїв і успішно відокремлювати сперміі від сім'яної плазми без відділення сперміїв високої якості. За цього методу сперма не втрачає своїх якісних характеристик протягом одного тижня зберігання (Morrell et al., 2019). Результати досліджень вчених (Martínez-Pastor et al., 2021) показали, що зараження сперми бактеріями можна контролювати шляхом центрифугування через колоїди 20 % і 30 % Porcicoll ще нижчої щільності (1,026 г/мл і 1,039 г/мл). Обидва колоїди призводили до значного зменшення або повного видалення деяких бактерій. Колоїдне центрифугування не вплинуло на якість сперми.

У жеребців для відокремлення сперміїв від бактерій в еякуляті також використовують колоїдне центрифугування. Цей метод є порівняно простою процедурою і продовжує виживання сперміїв без додавання антибіотиків у розріджувач сперми (Morrell et al., 2014; Al-Kass et al., 2019). Показано, що якість сперми у жеребців після одношарового центрифугування поліпшується (Johannisson et al., 2009) та значно знижується кількість бактерій у зразку (Morrell & Nunes, 2018). Одношарове центрифугування було ефективне у видаленні від 81 % до > 90 % бактерій із сперми жеребця, залежно від бактеріального навантаження та виду (Morrell et al., 2014). Al-Kass et al. (2019) отримали аналогічні результати дослідження, проте вони виявили, що 25 % бактерій залишалися у зразках після одношарового центрифугування, якщо у розріджувачі були присутні антибіотики, тимчасом як у інших зразках, де антибіотики не додавалися, реєстрували тільки 18 % бактерій після одношарового центрифугування. В іншому експерименті зі спермою жеребця було виявлено, що одношарове центрифугування з використанням Androcoll-E перед заморожуванням знижує загальне бактеріальне навантаження після відтавання і позитивно впливає на рухливість (Guimarães et al., 2015).

Іншим фізичним методом, що застосовується для зниження мікробної активності, є мікрофільтрація сім'яної плазми. Крім зниження бактеріального забруднення сперми кнура, мікрофільтрація поліпшує деякі параметри сперміїв, такі як рухливість, цілісність плазматичної мембрани та акросоми, а також мітохондріальну активність (Barone et al., 2016).

Антимікробні пептиди. Останнім часом дослідження були зосереджені на використанні антимікробних пептидів, які можуть дестабілізувати клітинну стінку бактерій (Santos & Silva, 2020). Доведено, що антимікробні пептиди контролюють ріст аеробних та анаеробних бактерій у порівняно низьких концентраціях без шкідливого впливу на якість сперми та фертильність (Cordis, 2019).

Дослідники (Schulze et al., 2014) виявили, що низькі концентрації деяких циклічних гексапептидів (відомих як c-WFW і c-WWW) давали подібні результати з гентаміцином (широко використовуваним протимікробним засобом для розріджувачів сперми) з погляду відсутності впливу на якість сперми або частоту настання вагітності після штучного осіменіння. Зокрема, пептид c-WFW позитивно впливав на рухливість сперміїв. Однак не всі представники цього класу сполук підходили для використання в розріджувачах сперми, оскільки синтетичні амідні похідні магаініну II, MK5E викликали зниження рухливості сперміїв та порушення цілісності мембрани, що супроводжувалося незворотною рухливістю фосфатидилхоліну в мембрані сперміїв (Morrell & Wallgren, 2014). Повідомлялося, що інший пептид, GL13K, активний проти біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* (Hirt & Gorr, 2013).

Ряд науковців (Bussalleu et al., 2017) досліджували використання протимікробних пептидів, а саме: PR-39, який багатий на пролін та аргінін; 36 (PMAP-36) та 37 (PMAP-37), які належать до групи свинячих мієлоїдних протимікробних пептидів. Автори спостерігали, що PMAP-37 у концентраціях 0,5, 1 та 3 мкм знижував бактеріальне навантаження до 10 днів, а

також поліпшував життєздатність сперміїв. Крім того, PR-39 (20 мкм) сприяв інгібуванню бактерій, але було виявлено, що він цитотоксичний для сперми кнурів, тимчасом як PMAP-36 не виявляв жодної протимікробної дії.

Інші пептиди свинячого походження, такі як бета-дефенсин-1 (PBD-1) та бета-дефенсин-2 (PBD-2), можуть використовуватися як протимікробні агенти. Puig-Timonet et al. (2018) виявили, що обидва пептиди в концентрації 3 мкм не погіршували життєздатності й рухливості сперміїв і були здатні певною мірою контролювати мікробний ріст. Так само було показано, що ε-полілізин (від 40 до 128 мг/мл) ефективно інгібує зростання бактерій, поліпшує якість сперми та запліднення in vitro, здатний замінити 50 % гентаміцину, використовуваного в розріджувачах (Shaoyong et al., 2019).

Пептид LEAP2, ефективність якого не залежить ні від навколишнього середовища, ні від сезону, можна безпечно використовувати як замінник антибіотиків у розчинниках для консервування сперми кнурів при 17 °C. На підставі експерименту in vitro іспанські вчені спостерігали, що пептид LEAP2 у концентрації 2,5 мкм не знижував запліднювальної здатності сперміїв, а за результатами in vivo використання пептиду LEAP2 у концентрації 2,5 мкм в середовищі, що не містить антибіотиків, дозволяє контролювати зростання аеробних та анаеробних мікробів, не справляючи негативного впливу ні на якість сперми, ні на її здатність до запліднення (Cordis, 2019).

Бактеріоцини, антимікробні пептиди, що продукуються деякими бактеріями, можуть розглядатися як альтернатива традиційним антибіотикам. Ці молекули виявляють значну ефективність щодо інших бактерій (включаючи стійкі до антибіотиків штами), стабільні та можуть мати вузький або широкий спектр дії (Cotter et al., 2013). Вчені (Jakop et al., 2021) дослідили вплив трьох різних бактеріоцинів (з відомою бактеріолітичною активністю щодо *Escherichia coli*) на якість сперми і на ріст бактерій *E. coli* ILSH 02692 у розведеній спермі розріджувачами без антибіотиків. Нижчі концентрації (0,01 і 0,25 %) всіх бактеріоцинів не впливали на якість сперми, більш високі концентрації (0,5 і 1,0 %) двох бактеріоцинів призводили до значного зниження якісних характеристик деяких сперміїв. Бактеріоцин 860/1 с не впливав на якість сперми в жодній з тестованих концентрацій та у всіх протестованих розріджувачах (BTS, MIII, Androstar Premium та Androhep усі без антибіотиків) як при 16 °C, так і при 6 °C. Цей бактеріоцин знижував ріст *E. coli* ILSH 02692 у спермі, розведеній розріджувачем BTS, на 50 % порівняно з контролем без бактеріоцину. Крім того, вибраний бактеріоцин не впливав на фертильність.

Наночастинки. Для контролю за мікробним навантаженням сперми кнурів без негативного впливу на її якість запропоновано використання наночастинок як альтернативу антибіотикам (Tsakmakidis et al., 2020). Наночастинки розміром 40–60 нм мають значну антимікробну здатність щодо *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus* (Guzman et al., 2012). Науковці (Li et al., 2010), досліджуючи механізм дії наночастинок Ag, виявили, що 10 мкг наночастинок Ag/мл можуть повністю стримувати зростання 107 КУО/мл клітин *Escherichia coli*, пошкоджуючи структуру клітинної мембрани, обмежуючи активність ферментів та індукуючи загибель бактерій. Використання наночастинок оксиду заліза (Fe_3O_4) при обробці сперми кнура давало легкий антибіотичний ефект без будь-яких побічних дій на характеристики сперми (Tsakmakidis et al., 2020).

Інші альтернативні засоби. У недавніх дослідженнях науковцями запропоновано використання нових природних біологічно активних продуктів для заміни антибіотиків у технології зберігання сперми.

Hensel et al. (2020) опублікували протокол зберігання сперми кнурів при низькій температурі – 5 °C з використанням двох різних ліпопептидів у розріджувачі AndroStarPremium. Ліпопептиди мають багато переваг антимікробних пептидів, але водночас їх виготовлення потребує менше часу та грошей, що робить їх доступнішими для потенційного подальшого комерційного використання у розріджувачах сперми (Dawgul et al., 2017).

Інша альтернатива протимікробним препаратам включає речовини різного походження, такі як коєва кислота (5-гідрокси-2-гідроксиметил-1,4-пірон), вторинний слабокислотний метаболіт, що продукується аеробною ферментацією грибів *Aspergillus* і *Acetobacter* (Song et al., 2019). Було доведено, що вона інгібує зростання бактерій (у концентраціях від 20 до 100 мг/мл) у розведеній спермі кнурів та впливає (40 мг/мл) на якість сперми, капацитацію сперміїв, кількість сперміїв, прикріплених до яйцеклітини та ембріональний розвиток (Shaoyong et al., 2019). Jakop et al. (2019) повідомили, що додавання жирних кислот, що трапляються в природі, підвищує рухливість сперміїв при низькотемпературному зберіганні і дозволяє зберегти більшу кількість мітохондріально активних сперміїв.

Крім того, було продемонстровано, що йод метіонін, новий тип хелатної сполуки амінокислоти, інгібує проліферацію бактерій типу Proteobacteria і роду *Staphylococcus* та *Pseudomonas*, а також поліпшує рухливість сперміїв, цілісність плазматичних мембран і акросом у спермі кнурів після 6 днів зберігання (Fang et al., 2017).

Закордонні лабораторії IMV повідомили про використання BactiBag, пакета для сперми з бактеріостатичними молекулами, який продемонстрував здатність контролювати ріст бактерій під час зберігання сперми кнурів протягом 3 днів (Camugli et al., 2019).

Вчений Abd-Allah S. M. (2010) виявив, що використання 0,4 % маточного молочка при кріоконсервації сперми бугаїв поліпшило характеристики життєздатності та фертильності сперміїв. Маточне молочко містить антимікробний компонент 10-гідрокси-2-деценову кислоту (Blum et al., 1959), що також може використовуватися як протимікробний засіб, і потребує подальшого дослідження.

Іншою цікавою альтернативою може бути використання алое вера, яке володіє бактерицидними властивостями (Radha & Laxmipriya, 2014). Нещодавно повідомлялося про використання цієї рослини як ефективного кріопротектора для баранячої сперми (Brito et al., 2014) та сперми бугаїв (Farias et al., 2019), але

антимікробний потенціал алое вера для зберігання сперми ще не досліджувався.

Аналогічне дослідження було зосереджено на оцінці екстрактів водоростей та їх придатності для зберігання сперми кнурів. Результати показали, що екстракти не мали протимікробної активності широкого спектру дії і, отже, не були достатньо ефективні для повної заміни антибіотиків у розріджувачах. Проте комбінація екстрактів водоростей зі звичайними антибіотиками або іншими новими протимікробними сполуками може забезпечити корисні переваги для зберігання сперми. Їх селективний вплив на певні види бактерій дає можливість створювати середовища з більш специфічним спектром антимікробної активності, адаптовані до індивідуальних потреб різних центрів штучного осіменіння та бактеріальної флори, що виявляється там (Hensel et al., 2021).

Українські науковці Сідашова С. О. та ін. (Sidashova et al., 2020) запропонували для розрідження сперми кнурів використовувати молочний розріджувач без додавання антибіотиків (питне коров'яче молоко тривалого зберігання, стерилізоване за ультрависокими температурними технологіями). Результати досліджень показали, що при застосуванні даного середовища виживаність сперміїв при температурі зберігання +5–10 °С (при рухливості більше 6 балів) становила до 4 діб. Заплідненість свиноматок за штучного осіменіння сягала 72,5 %.

Висновки

З огляду на все вищевикладене, можна дійти висновку, що технології зберігання сперми свійських тварин протягом останніх років зазнали безліч змін. Додавання антибіотиків до розріджувачів сперми широко застосовується у всьому світі, хоча багато мікроорганізмів у спермі тварин можуть бути стійкими до них. Зважаючи на негативний вплив антибіотиків на якість сперміїв та їхню запліднюючу здатність, постійно удосконалюються та створюються нові альтернативні методи для зберіганні сперми: низькотемпературне зберігання, фізичні методи зниження бактеріального навантаження, антимікробні пептиди, наночастинки та використання різних речовин тваринного, рослинного або іншого походження. Можливість низькотемпературного зберігання сперми кнурів може відкрити абсолютно нові підходи у майбутньому за допомогою оптимізації швидкості охолодження. Колоїдне центрифугування як один з фізичних методів є практичним засобом зниження бактеріального навантаження у зразках сперми і його можна ефективно застосовувати з використанням обладнання, яке наявне у багатьох племзаводах. Антимікробні пептиди або наночастинки оксиду заліза можуть стати корисною альтернативою додаванню антибіотиків при зберіганні сперми. Доведено, що антимікробні пептиди контролюють ріст аеробних та анаеробних бактерій у порівняно низьких концентраціях без шкідливого впливу на якість сперми та фертильність. Разом з тим обґрунтовано, що наночастинки розміром 40–60 нм мають значну антимікробну здатність щодо *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus.* Водночас необхідні подальші дослідження щодо застосування різних речовин тваринного або рослинного походження (маточне молочко, алое вера, екстракти водоростей), а також визначення адекватних концентрацій цих нових сполук, які повинні бути ефективні проти бактерій без погіршення якості сперми.

Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

References

Abd-Allah, S. M. (2010). Effect of royal jelly on bovine sperm characteristics during post – thaw incubation *in vitro*. Revista Veterinaria, 21(2), 81–85. DOI: 10.30972/vet.2121747.

Al-Kass, Z., Spergser, J., Aurich, C., Kuhl, J., Schmidt, K., & Morrell, J. M. (2019). Effect of presence or absence of antibiotics and use of modified single layer centrifugation on bacteria in pony stallion semen. Reproduction in Domestic Animals, 54(2), 342–349. DOI: 10.1111/rda.13366.

Althouse, G. C. (2008). Sanitary procedures for the production of extended semen. Reproduction in Domestic Animals, 43(2), 374–378. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01187.x.

Aurich, C., & Spergser, J. (2007). Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. Theriogenology, 67(5), 912–918. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.11.004.

Barone, F., Ventrella, D., Zannoni, A., Forni, M., & Bacci, M. L. (2016). Can microfiltered seminal plasma preserve the morphofunctional characteristics of porcine spermatozoa in the absence of antibiotics? A preliminary study. Reproduction in Domestic Animals, 51(4), 604–610. DOI: 10.1111/rda.12699.

Blum, M. S., Novak, A. F., & Taber, S. (1959). 10-Hydroxy-delta2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jell. Science, 130(3373), 452–453. DOI: 10.1126/science.130.3373.452.

Brito, B. F., Antunes, L. P., Rodrigues, F. R. N., Salgueiro, C. C. M., Cavalcante, J. M. M., & Nunes, J. F. (2014). Effect of Aloe vera added in different concentrations to Powdered Coconut Water (ACP-102®) in ram semen diluted and incubated for two hours. Acta Veterinaria Brasilica, 8, 242–243. DOI: 10.21708/avb.2014.8.0.3963.

Bussalleu, E., Sancho, S., Briz, M. D., Yeste, M., & Bonet, S. (2017). Do antimicrobial peptides PR-39, PMAP-36 and PMAP-37 have any effect on bacterial growth and quality of liquid-stored boar semen? Theriogenology, 89, 235–243. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.017.

Camugli, S., Eterpi, M., Gavin-Plagne, L., Gonzalez, A., Gorges, J-C., Vanssay, A., & Schmitt, É. (2019). Bactibag®: An opportunity to reduce the use of antibiotics in boar semen processing. Theriogenology, 137, 128. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.052.

Casas, I., & Althouse, G. C. (2013). The protective effect of a 17 °C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 °C. Cryobiology, 66(1), 69–75. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.11.006.

Catry, B., Van Duijkeren, E., Pomba, M. C., Greko, C., Moreno, M. A., Pyörälä, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E. J., Ungemach, F., Törneke, K., Munoz-Madero, C., & Torren-Edo, J. (2010). Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. Epidemiology & Infection, 138(5), 626–644. DOI: 10.1017/S0950268810000014.

Cordis (2019). An alternative to antibiotics in porcine semen doses. URL: https://cordis.europa.eu/project/id/867184/reporting.

Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? Nature Reviews Microbiology, 11(2), 95–105. DOI: 10.1038/nrmicro2937.

Dawgul, M. A., Greber, K. E., Bartoszewska, S., Baranska-Rybak, W., Sawicki, W., & Kamysz, W. (2017). In Vitro evaluation of cytotoxicity and permeation study on lysine- and arginine-based lipopeptides with proven antimicrobial activity. Molecules, 22(12), 2173. DOI: 10.3390/molecules22122173.

Duijkeren, E. V., Box, A. T., Schellen, P., Houwers, D. J., & Fluit, A. C. (2005). Class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from clinical infections of horses and dogs in The Netherlands. Microbial Drug Resistance, 11(4), 383–386. DOI: 10.1089/mdr.2005.11.383.

Estienne, M. J., Harper, A. F., & Day, J. L. (2007). Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18 °C. Biology of Reproduction, 7(3), 221–231. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18059974.

Fang, Q., Wang, J., Hao, Y. Y., Li, H., Hu, J. X., Yang, G. S., & Hu, J. H. (2017). Effects of iodine methionine on boar sperm quality during liquid storage at 17 °C. Reproduction in Domestic Animals, 52(6), 1061–1066. DOI: 10.1111/rda.13024.

Farias, C. F. A., Tork, A. L. P., Rique, A. S., Queirós, A. F., & Silva, S. V. (2019). Study of Aloe vera efficacy as a plant origin extender in the cooling on bovine epididymal spermatozoa. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 43(3), 787–794. URL: https://www.cabdirect.org/ globalhealth/abstract/20193472448.

Foote, R. H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. Journal of Animal Science, 80, 1–10. DOI: 10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_21a.

Goldberg, A. M. G., Argenti, L. E., Faccin, J. E., Linck, L., Santi, M., Bernardi, M. L., Cardoso, M. R. I., Wentz, I., & Bortolozzo, F. P. (2013). Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. Research in Veterinary Science, 95(2), 362–367. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.06.022.

Guimarães, T., Lopes, G., Pinto, M., Silva, E., Miranda, C., Correia, M. J., Damásio, L., Thompson, G., & Rocha, A. (2015). Colloid centrifugation of fresh stallion semen before cryopreservation decreased microorganism load of frozen-thawed semen without affecting seminal kinetics. Theriogenology, 83(2), 186–191. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.09.003.

Guzman, M., Dille, J., & Godet, S. (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8(1), 37–45. DOI: 10.1016/j.nano.2011.05.007.

Hensel, B., Jakop, U., Scheinpflug, K., Mühldorfer, K., Schröter, F., Schäfer, J., & Schulze, M. (2020). Low temperature preservation of porcine semen: Influence of short antimicrobial lipopeptides on sperm quality and bacterial load. Scientific Reports, 10(1), 13225. DOI: 10.1038/s41598-020-70180-1.

Hensel, B., Jakop, U., Scheinpflug, K., Schröter, F., Sandmann, M., Mühldorfer, K., & Schulze, M. (2021). Low temperature preservation: Influence of putative bioactive microalgae and hop extracts on sperm quality and bacterial load in porcine semen. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 19, 100359. DOI: 10.1016/j.scp.2020.100359.

Hirt, H., & Gorr, S. U. (2013). Antimicrobial peptide GL13K is effective in reducing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57(10), 4903–4910. DOI: 10.1128/AAC.00311-13.

Jäkel, H., Scheinpflug, K., Mühldorfer, K., Gianluppi, R., Lucca, M. S., Mellagi, A. P. G., & Waberski, D. (2021). *In vitro* performance and *in vivo* fertility of antibiotic-free preserved boar semen stored at 5 °C. Journal of Animal Science and Biotechnology, 12(1), 9. DOI: 10.1186/s40104-020-00530-6.

Jakop, U., Hensel, B., Orquera, S., Rößner, A., Alter, T., Schröter, F., Grossfeld, R., Jung, M., Simmet, C., & Schulze, M. (2021). Development of a new antimicrobial concept for boar semen preservation based on bacteriocins. Theriogenology, 173, 163–172. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.08.004.

Jakop, U., Svetlichnyy, V., Schiller, J., Schulze, M., Schröter, F., & Müller, K. (2019). In vitro supplementation with unsaturated fatty acids improves boar sperm viability after storage at 6°C. Animal Reproduction Science, 206, 60–68. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.05.008.

Johannisson, A., Morrell, J. M., Thorén, J., Jönsson, M., Dalin, A.-M., & Rodriguez-Martinez, H. (2009). Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. Animal Reproduction Science, 116(1-2), 119–128. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2009.01.008.

Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., Ouyang, Y. S., & Chen, Y. B. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology, 85(4), 1115–1122. DOI: 10.1007/s00253-009-2159-5.

Malmgren, L., Olsson, E. E., Engvall, A., & Albihn, A. (1998). Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relationship to fertility under field conditions. Acta Veterinaria Scandinavica, 39(2), 173–182. DOI: 10.1186/BF03547790.

Martínez-Pastor, F., Lacalle, E., Martínez-Martínez, S., Fernández-Alegre, E., Álvarez-Fernández, L., Martinez-Alborcia, M.-J., Bolarin, A., & Morrell, J. M. (2021). Low density Porcicoll separates spermatozoa from bacteria and retains sperm quality. Theriogenology, 165, 28–36. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.02.009.

Maxwell, W. M. C., & Johnson, L. A. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. Theriogenology, 48(2), 209–219. DOI: 10.1016/S0093-691X(97)84068-X.

Menezes, T. A., Mellagi, A. P. G., da Silva Oliveira, G., Bernardi, M. L., Wentz, I., Ulguim, R. D. R., &

Bortolozzo, F. P. (2020). Antibiotic-free extended boar semen preserved under low temperature maintains acceptable in vitro sperm quality and reduces bacterial load. Theriogenology, 149, 131–138. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.03.003.

Morrell, J. M. (2011). Artificial Insemination: Current and Future Trends. In M. Manafi (Ed.). Artificial Insemination in Farm Animals (pp. 1 – 14). IntechOpen. DOI: 10.5772/17943.

Morrell, J. M., & Nunes, M. M. (2018). Practical guide to Single Layer Centrifugation of stallion semen. Equine Veterinary Education, 30(7), 392–398. DOI: 10.1111/eve.12658.

Morrell, J. M., & Wallgren, M. (2011). Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. Animal Reproduction Science, 123(1-2), 64–69. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.11.005.

Morrell, J. M., & Wallgren, M. (2014). Alternatives to antibiotics in semen extenders: a review. Pathogens, 3, 934 – 946. DOI: 10.3390/pathogens3040934.

Morrell, J. M., Klein, C., Lundeheim, N., Erol, E., & Troedsson, M. H. T. (2014). Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. Animal Reproduction Science, 145(1-2), 47–53. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.01.005.

Morrell, J. M., Núñez-González, A., Crespo-Félez, I., Martínez-Martínez, S., Martínez Alborcia, M-J., Fernández-Alegre, E., Dominguez, J. C., Gutiérrez-Martín, C. B., & Martínez-Pastor, F. (2019). Removal of bacteria from boar semen using a low-density colloid. Theriogenology, 126, 272–278. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.12.028.

Morrell, J. M., Saravia, F., Van Wienen, M., Wallgren, M., & Rodriguez-Martinez, H. (2009). Selection of boar spermatozoa using centrifugation on a glycidoxypropyltrimethoxysilane-coated silica colloid. Journal of Reproduction and Development, 55(5), 547–552. DOI: 10.1262/jrd.20243.

Paschoal, A. F. L., Luther, A. M., Jäkel, H., Scheinpflug, K., Mühldorfer, K., Bortolozzo, F. P., & Waberski, D. (2020). Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5 °C. PLoS ONE, 15(6), e0234339. DOI: 10.1371/journal. pone.0234339.

Puig-Timonet, A., Castillo-Martín, M., Pereira, B. A., Pinart, E., Bonet, S., & Yeste, M. (2018). Evaluation of porcine beta defensins-1 and -2 as antimicrobial peptides for liquid-stored boar semen: effects on bacterial growth and sperm quality. Theriogenology, 111, 9–18. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.01.014.

Radha, M. H., & Laxmipriya, N. P. (2014). Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of Aloe vera: A systematic review. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 5(1), 21–26. DOI: 10.1016/j.jtcme.2014.10.006.

Santos, C. S., & Silva, A. R. (2020). Current and alternative trends in antibacterial agents used in mammalian semen technology. Animal Reproduction, 17(1), e20190111. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2019-0111.

Schulze, M., Ammon, C., Rüdiger, K., Jung, M., & Grobbel, M. (2015). Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. Theriogenology, 83(3), 430–437. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.004.

Schulze, M., Jung, M., & Hensel, B. (2022). Science-based quality control in boar semen production. Molecular Reproduction and Development, 1–9. DOI: 10.1002/mrd.23566.

Schulze, M., Junkes, C., Mueller, P., Speck, S., Ruediger, K., Dathez, M., & Mueller, K. (2014). Effects of Cationic Antimicrobial Peptides on Liquid-Preserved Boar Spermatozoa. PLoS ONE, 9(6), e100490. DOI: 10.1371/journal.pone.0100490.

Shaoyong, W., Li, Q., Ren, Z., Wei, C., Chu, G., Dong, W., Yang, G. S., & Pang, W. J. (2019). Evaluation of ε-polylysine as antimicrobial alternative for liquid-stored boar semen. Theriogenology, 130, 146–156. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.03.005.

Shaoyong, W., Li, Q., Ren, Z., Xiao, J., Diao, Z., Yang, G., & Pang, W. (2019). Effects of kojic acid on boar sperm quality and anti-bacterial activity during liquid preservation at 17 C. Theriogenology, 140, 124–135. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.08.020.

Sidashova, S. O., Humennyi, O. H., Khalak, V. I., Susol, R. L., Lobchenko, V. O., Stryzhak, T. A., Lobchenko, S. F., & Stryzhak, A. V. (2020). UA Patent No. 141818. Kyiv: DP "Ukrainskyi instytut intelektualnoi vlasnosti" (in Ukrainian).

Smole, I., Thomann, A., Frey, J., & Perreten, V. (2010). Repression of common bull sperm flora and *in vitro* impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant. Reproduction in Domestic Animals, 45(4), 737–742. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01319.x.

Song, L., Xie, W., Zhao, Y., Lv, X., Yang, H., Zeng, Q., Zheng, Z., & Yang, X. (2019). Synthesis, antimicrobial, moisture absorption and retention activities of kojic acid-grafted konjac glucomannan oligosaccharides. Polymers, 11(12), 1–12. DOI: 10.3390/polym11121979.

Tsakmakidis, I. A., Samaras, T., Anastasiadou, S., Basioura, A., Ntemka, A., Michos, I., Simeonidis, K., Karagiannis, I., Tsousis, G., Angelakeris, M., & Boscos, C. M. (2020). Iron Oxide Nanoparticles as an Alternative to Antibiotics Additive on Extended Boar Semen. Nanomaterials, 10(8), 1568. DOI: 10.3390/nano10081568.

Van Boeckel, T. P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., & Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. Science, 365(6459), eaaw1944. DOI: 10.1126/science.aaw1944.

Waberski, D., Luther, A. M., Grunther, B., Jakel, H., Henning, H., Vogel, C., & Weitze, K. F. (2019). Sperm function *in vitro* and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. Scientific Reports, 9(1), e14748. DOI: 10.1038/s41598-019-51319-1.

Wallgren, M. (1996). Screening of mycoplasmal and bacterial content in semen from Swedish AI-boars, 14th International pig veterinary society congress. Bologna: University of Bologna. Faculty of veterinary medicine.

Wasilewska, K., & Fraser, L. (2017). Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. Animal Reproduction Science, 185, 161–173. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.08.016.