

REZUMAT

Scopul cercetărilor se referă la studiul unor procese de reproducție la suine utilizând o metodă biotehnică nouă și modernă de însămânțare artificială a scroafelor, alături de perfecționarea metodelor de apreciere a valorii biologice a materialului seminal de vier.

În urma aplicării în practica curentă a însămânțării artificiale intrauterine (I.A.I.U.) la scroafe se urmărește îmbunătățirea fertilității, pentru o eficiență economică cât mai mare. Ca obiective generale s-au urmărit: - cunoașterea parametrilor de reproducție din unele ferme de creștere a porcilor; - crearea unui studiu experimental comparativ privind însămânțarea artificială endocervicală și însămânțarea artificială intrauterină; - implementarea însămânțării artificiale intrauterine în managementul unui complex industrial.

În prezenta teză, s-a ales alături de parametri uzuali, ca principal parametru de calitate al materialului seminal *încărcătura microbiologică*, analizată sub aspect cantitativ și calitativ. Astfel, s-a avut în vedere următoarele activități: Determinarea calitativă și cantitativă atât a bacteriilor cât și a fungilor; Identificarea punctelor critice de contaminare a spermei în timpul recoltării; Modalități de reducere a contaminării în punctele critice; și Eficiențizarea aseptizării antifungice prin diluție, a materialului seminal de vier.

Un alt criteriu pentru evaluarea valorii biologice a materialului seminal de vier, este reprezentat de gradul de rezistență a spermatozoizilor. „Rezistența” spermatozoizilor este dată de proprietatea acestora de a rezista la acțiunea nocivă a unui „toxic”. Soluția de clorură de sodiu, concentrație 1% este folosită în acest scop. Unii autori afirmă că longivibilitatea și fecunditatea spermatozoizilor este cu atât mai ridicată cu cât spermatozoizii își mențin mobilitatea într-un volum mai mare de soluție NaCl 1%.

Prezenta teză însumează un număr total de 225 de pagini, fiind ilustrată în 47 de tabele și 56 de figuri.

Partea I – Stadiul cunoașterii – este alcătuită din 65 de pagini, reprezentând 30,95% din volumul lucrării, alcătuită din 6 capitole în care sunt sumarizate informațiile selectate din 196 surse bibliografice din literatura română și străină referitoare la biotehnologiile de reproducție la scroafe și evaluarea biologică a materialului seminal de vier.

Partea a II-a – Cercetări proprii – este desfășurată pe parcursul a 145 pagini (69,05% din volumul lucrării) cuprinse în 10 capitole, urmărind scopul și obiectivele propuse, iar în final

prezenta teză se încheie cu concluzii finale, recomandări și bibliografie. Fiecare capitol este structurat din material și metodă de lucru, rezultate și discuții, și concluzii parțiale.

Cercetările au fost derulate în cadrul a trei ferme de creștere a suinelor, situate în N-E și S-E României. Materialul biologic studiat a fost reprezentat de vieri și scroafe de înaltă valoare genetică, loturi matcă ce au fost achiziționate de la companii de specialitate.

Statusul parametrilor de reproducție din unele ferme de creștere a suinelor

Din analiza datelor reiese că scroafele inseminate endocervical (I.A.Ec.) cu 5×10^9 spermatozoizi pe doză, au avut atât valorile fecundității (71,85%), cât și a prolificității (8,55 purcei/fătare), mai scăzute. Însă la fermele unde se utilizau I.A.Ec. cu $4,5 \times 10^9$, și respectiv 4×10^9 spermatozoizi/doză, cei doi parametri esențiali au avut valori mai ridicate: 78,8% cu 9,06 purcei; respectiv 84,27% cu 9,6 purcei/fătare.

Creșterea fecundității nu o putem corela cu scăderea numărului de spermatozoizi pe doza de inseminat. Explicația și-ar găsi răspunsul în influența condițiilor diferite de exploatare și zooigienă (între ferma 1 și 2), corelat cu specializarea tehnicienilor operatori – însămânțători.

Prin folosirea metodei de I.A.Ec, numărul de celule seminale folosit trebuie să fie destul de mare pentru a se putea realiza o populare suficientă a oviductelor în vederea realizării fecundației. Se constată prin această metodă o pierdere a spermatozoizilor, pe de o parte, dată de refularea materialului seminal, și pe de altă parte, - prin moartea spermatozoizilor din cauza incapacității lor de a depăși cele două praguri cruciale (cervixul și joncțiunea utero-tubară).

Studiu experimental privind însămânțarea artificială intrauterină (I.A.I.U.)

Prin practicarea I.A.I.U. s-a reușit îmbunătățirea fecundității scroafelor cu 6,9%, diferențiat cu sezonul însămânțării. De asemenea, la fătare, s-au obținut în plus la lotul LE, 0,19 purcei, ceea ce a condus la întârziere la o diferență între loturi de 0,12 purcei/scroafă.

Lotul martor (L.M.) a fost inseminat cu 4×10^9 spermatozoizi, iar metoda de inseminare a fost clasică, iar lotul experimental (L.E.) cu 3×10^9 folosind metoda intrauterină. Fecunditatea lotului martor (LM) a fost de 81,7%, iar la (L.E.), de 88,6%. Prolificitatea medie anuală a scroafelor din LM a fost de 11,27 purcei, insensibil mai mică față de cea înregistrată la LE de 11,46 purcei. Deși diferența este mică, în valori absolute, aceasta reprezintă 0,19 purcei/fătare, ceea ce pentru practică, în condițiile unui complex în care există cca. 12000 de fătări/an, înseamnă un plus de 2280 de purcei.

Această creștere sezonieră a fecundității și prolificității poate fi corelată cu dinamica procesului de spermatogeneză, dependent de temperatura ambientală.

Analizând fecunditatea celor două loturi raportate la numărul de spermatozoizi pe doză, și corelate cu tipul de înșămânțare, constatând că fecunditatea nu depinde de numărul de spermatozoizi din doză (3 miliarde), ci de locul de depunere a acestora și de pierderile suferite după înseminare.

Implementarea înșămânțării artificiale intrauterine în managementul unui complex industrial

Pentru a cunoaște în detaliu activitatea de reproducție și pentru a putea explica unele mecanisme intime ale acestui proces complex, s-a urmărit întreg ciclul pe flux tehnologic începând cu recoltarea materialului seminal, până la parturiție, sau chiar până la înțărirea purcelor obținuți prin înseminarea intrauterină.

Referitor la numărul mediu de doze (cu 3×10^9) obținute dintr-un ejaculat într-un an, valoarea maximă a fost de 49 doze obținută de la un vier PIC de 1,8 ani, iar valoarea minimă 32 doze la un Pietrain de 1 an. Media a fost de 39 doze, oscilațiile acestor valori sunt date de spermatogeneză și influențate desăvârșită și de adaptabilitatea raselor. Cu dozele preparate s-au însemnat un număr total de 10713 scroafe, media scroafelor înseminate cu doze provenite de la un vier pe un an calendaristic a fost de 1339 scroafe/an. Din totalul scroafelor I.A.I.U. s-au diagnosticate gestante, un procent mediu pe an de activitate de 84,37, cu limite de 80,93% în sezonul cald și 87,8% în sezonul rece.

Prolificitatea medie a vierilor a fost calculată pe baza prolificității scroafelor; astfel, prolificitatea a variat de la 10,47 (PIC de 4,5 ani) la 11,15 (Pietrain de 1 an). Prolificitatea medie/an a avut valoarea de 10,72 purcei din care: 7,38 au fost P.Po., 2,88 - P.Sp., și un număr de purcei eliminați de 0,43 (P.Mo, P.Mu., și P.Nv.).

Introducerea I.A.I.U. pe flux tehnologic al activității de reproducție într-un complex zootehnic de creștere a porcilor este un succes, obținând o economie de celule seminale, corelată cu o fecunditate și prolificitate rentabilă. Recomandăm astfel, implementarea în managementul activității de reproducție a fermelor de tip industrial, I.A.I.U. cu 3×10^9 celule seminale pentru a spori eficiența economică.

Examenul microbiologic al materialului seminal de vier

Examenul microbiologic cantitativ, a urmărit identificarea numărului de bacterii și numărul de fungi din materialul seminal proaspăt recoltat, din cel diluat și din dozele conservate.

Numărul total de bacterii pe ml S.B. a înregistrat valoarea medie de $98,41 \times 10^3$ în cele două ferme. În cadrul fermei 1, valorile NTG-ului/ml S.B., au fost cuprinse între $22,4 \times 10^3$

UFC/ml și $118,2 \times 10^3$ UFC/ml cu o medie de $65,4 \times 10^3$ UFC/ml. Valorile NTG-ului în ferma 2 au fost cuprinse între $74,6 \times 10^3$ UFC/ml și $130,05 \times 10^3$ UFC/ml, cu o medie de $99,33 \times 10^3$ UFC/ml. După obținerea dozelor de inseminat, prin diluarea materialului seminal, valoarea medie a NTG-ului fermelor, a fost de $0,354 \times 10^3$ UFC/ml. La ferma 1, NTG-ul s-a redus drastic de la $65,49 \times 10^3$ UFC/ml la $0,120 \times 10^3$ UFC/ml. În probele examinate de la ferma 2 se observă deasemenea, că numărul bacteriilor au scăzut după diluare (media fiind de $0,588 \times 10^3$ UFC/ml NTG/ml), dar valorile acestora rămân ridicate.

Numărul total de fungi pe ml S.B. a atins valoarea medie a fermelor de $0,1485 \times 10^3$ UFC/ml. Încărcătura micologică are valori relativ constante, fiind cuprinse între $0,116 \times 10^3$ UFC/ml și $0,287 \times 10^3$ UFC/ml, cu o medie de $0,194 \times 10^3$ UFC/ml, la ferma 2. La ferma 1, valoarea medie a fost de $0,103 \times 10^3$ UFC/ml cu variații între $0,081 \times 10^3$ UFC/ml și $0,130 \times 10^3$ UFC/ml. După diluare, numărul fungilor a rămas aproximativ constant, având valoarea de $0,1405 \times 10^3$ UFC/ml. Media acestora, în cadrul fermei 1 a fost de $0,089 \times 10^3$ UFC/ml, iar în ferma nr 2 de $0,192 \times 10^3$ UFC/ml.

Populațiile bacteriene viabile, din materialul seminal diluat, sunt considerate variante antibio rezistente, sau antibioticele conținute de diluanți nu au spectru de acțiune asupra tuturor genurilor bacteriene posibil existente, iar populația fungilor rămâne nemodificată.

Examenul calitativ al florei bacteriene izolate din sperma de vier demonstrează existența unei flore polibacteriene variate. Astfel s-au izolat un număr de 14 genuri. Frecvența cea mai mare a avut-o: *Escherichia coli* cu 81,8%, urmată de *Staphylococcus aureus* și *S. hyicus* cu 72,7 %, și *Pseudomonas aeruginosa* cu 63,6 % din totalul probelor examinate, cu o frecvență mai mică au fost identificate și *Yersinia enterocolitica* și *Y. ruckeri*, *Pantoea spp.*, *Shigella spp.*, *Serratia marcescens.*, *Tatumella spp.*. Analiza incidenței florei bacteriene din materialul seminal cercetat arată că în probele examinate predomină flora Gram negativă, fiind întâlnită în proporție de 71,4 %, iar flora Gram pozitivă în proporție de 28,6 %.

Examenul calitativ al florei micologice a identificat un număr de 9 genuri de fungi, atât fungi filamentoși cât și levuriformi. Cele mai frecvente genuri izolate dintre fungii filamentoși au fost: *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Mucor spp.*, *Fusarium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Alternaria spp.* Fungii levuriformi au fost întâlniți la fiecare determinare în mod constant și într-un grad variabil al concentrației. Cele mai frecvente levuri din genul *Candida* au fost *C. parapsilosis* și *C. sakei*.

Conservarea materialului seminal diluat se face la temperatura de 17°C, timp de una până la 7 zile; condiții propice creșterii și dezvoltării microorganismelor, iar prin procesele biochimice modifică substratul, respectiv și parametrii biologici ai materialului seminal.

Inseminarea unei scroafe cu un astfel de material seminal, duce frecvent infecunditate și la apariția unor ginecopatii oculte. Toate acestea se răsfrâng, în cele din urmă, asupra aspectului economic al unității respective.

Identificarea surselor de contaminare a spermei și punctele critice de contaminare

Puncte critice de contaminare a materialului seminal de vier în timpul recoltării sunt considerate prepuțul vierilor și aerul atmosferic al sălii de recoltare, acestea au înregistrat cea mai mare încărcătură bacteriană și fungică.

Atmosfera sălii de recoltare reprezintă sursa majoră de contaminare e spermei. Valorile numărului de germeni din atmosfera sălii de recoltare înaintea introducerii vierilor a înregistrat valoarea de 309×10^2 m³/aer. Valori mai mici comparativ cu cele obținute după recoltare (442×10^2 m³/aer). După introducerea celui de al patru-lea vier la recoltare încărcătura microbiologică din atmosfera sălii crește cu 43%.

Efectul contaminării asupra calității materialului seminal

Concentrației glucozei, valorile pH-ului și NTG-ul, au fost monitorizate în dinamica conservării timp de 96 de ore (T4) la +17°C. Acești parametri au fost interpretați și raportați la principalii indici de reproducție obținuți prin I.A. a materialului seminal din momentul T1, al conservării.

La ferma 1 media glucozei a fost de 527,5 mg/dl, după diluție (T0); 527,1 la 24 de ore (T1); 517,7 la 48 de ore (T2); 513,8 la 72 de ore (T3); 509,5 la 96 de ore (T4). În ferma 2 mediile au fost de: 526,3 la T0; 505,2 la T1; 482,0 la T2; 463,8 la T3. Reducerea cantității de glucoză în dinamică reprezintă consumul acesteia de către spermatozoizi, și este intim legată de calitatea diluantului folosit și de numărul de germeni prezenți.

În dozele de material seminal se găsește un număr variabil de microorganisme. NTG-ul variază de la 11 UFC/ml (în T0, la ferma 1), la 1926 UFC/ ml (în T3, la ferma 2). Dintre bacteriile identificate majoritatea, și toți fungii, au ca principal caracter biochimic consumarea glucozei și a fructozei. Aceasta explică scăderea concentrației de glucoză, și a valorilor pH-ului din dozele care au un NTG mai ridicat

Valorile medii ale pH-ului au variat de la 7,1 (la T0) la 6,6 (T4) în cadrul fermei 1; și de la 7,1 (la T0) la 5,5 (la T3). După 72 de ore de la diluare (T3), în timpul conservării, s-a constatat o scădere marcantă a valorii pH-ului, la probele recoltate din ferma 2, care au ajuns până la 5,5, din cauza activității metabolice a microorganismelor aflate într-o continuă creștere. Se observă o

corelație strânsă între NTG, valoarea pH-ului și consumul de glucoză; astfel cu cât NTG-ul are valori mai ridicate, cu atât pH-ul dozelor se modifică prin acidifiere și concentrația glucozei scade.

Se observă că fecunditatea celei mai mici îi corespund dozele ce au avut valorile NTG-ului cele mai ridicate. Această legătură între, valoarea NTG-ului dozelor conservate și procentul de fecunditate, se păstrează și în cazul comparării loturilor de scroafe ale fermelor respective. Media fertilității în ferma 1, a fost de 83,33%, cu un NTG de 16,7 UFC/ml, în momentul T1 al înșămânțării. Valorile fertilității au înregistrat cote mai scăzute în cazul fermei 2 (72,00%), unde NTG-ul a înregistrat valori mult mai crescute (328 UFC/ml în T1).

Putem să afirmăm, astfel, că există o corespondență între valoarea NTG/ml de material seminal diluat și capacitatea fecundantă a spermatozoizilor, exprimată prin procentul fecundității a ejaculatului studiat.

Posibilități de optimizare a reducerii contaminării în punctele critice de contaminare

În acest capitol s-a urmărit reducerea NTG-ului din sperma brută și cea diluată, prin aplicarea unor măsuri ce vizau principalele puncte critice de contaminare a spermei.

Prin aplicarea decontaminării preventive cu aerosoli a sălii de recoltare, NTG-ul din aer a scăzut cu peste 85% (de la $841,2 \times 10^2$ la $114,8 \times 10^2$ UFC/m³ aer). Remarcăm că numărul bacteriilor a scăzut la 810×10^2 la 110×10^2 UFC/m³ aer, iar cel al fungilor de la $31,2 \times 10^2$ la $4,8 \times 10^2$ UFC/m³ aer.

Un alt obiectiv ce urmărește reducerea contaminării în punctele critice este echiparea operatorului-recoltator cu două mănuși de recoltare una peste cealaltă. După practicarea toaletei locale, operatorul îndepărtează o mănușă și continuă recoltarea cu mănușa rămasă.

Încărcătura microbiologică a S.B. după aplicarea protocolului de igienă, a fost de $312,9 \times 10^2$ UFC/ml, comparativ cu $623,38 \times 10^2$ UFC/ml identificate inițial. Deci putem afirma că eficacitatea acestei acțiuni este 50,19%, reducând astfel încărcătura bacteriană din sperma brută la jumătate. În urma diluării, s-a constatat că NTG-ul din dozele de inseminat a înregistrat valoarea medie de $0,156 \times 10^2$ UFC/ml. Aceste valori obținute sunt mult mai reduse decât determinările anterioare, și cele citate în literatura de specialitate. Remarcăm că unele probe de material seminal diluat analizate, au fost sterile din punct de vedere bacteriologic. S-a reușit astfel, și îndepărtarea totală a fungilor filamentoși din sperma diluată, încărcătura în levuri având o medie de $1,39 \times 10^2$ UFC/ml.

Posibilități de aseptizare antifungică a materialului seminal

Pentru atingerea acestui deziderat s-a elaborat un protocol în vederea aseptizării materialului seminal de vier prin folosirea unor diluanți cu antimicotice. *Fluconazolul* a fost introdus în formula a doi diluanți frecvent utilizați în practică, în concentrații diferite. Au fost analizate în dinamică, efectele acestuia asupra calității spermatozoizilor conservați timp de 48 de ore, cu ajutorul analizorului C.A.S.A.

La o concentrație de 125 mg‰ Fluconazol introdus în formula diluantului A, valoarea progresivității spermatozoizilor a crescut cu 3,3%. Apreciem astfel că, în această concentrație Fluconazolul exercită un rol stimulatv asupra spermatozoizilor cel puțin pentru o perioadă de conservare de 12 ore, după diluare, la temperatura de +17°C. Analizând indicii proceselor de reproducție obținuți prin inseminare comparativă s-a constatat că nu există modificări între loturi, atât fecunditatea cât și prolificitatea sunt la aceleași valori comparabile.

Modificarea formulei diluanților, prin adăugarea fluconazolului în concentrație de 125 mg‰, este un câștig prin faptul că oferă posibilități mai bune de aseptizare a materialului seminal destinat conservării, iar acțiunea antimioticului nu afectează în sens negativ calitatea spermatozoizilor, și nici indicii de reproducție.

Aprecierea rezistenței spermatozoizilor de vier

Rezistența se exprimă prin numărul de ml de soluție NaCl 1% care opresc mișcarea de înaintare (rectilinie) a spermatozoizilor ce se găsesc într-un ml de material seminal. Unii autori afirmă că longivibilitatea și fecunditatea spermatozoizilor este cu atât mai ridicată cu cât spermatozoizii își mențin mobilitatea într-un volum mai mare de soluție de lucru. Valorile rezistenței spermatozoizilor obținute la 23 de vierii, au fost cuprinse între 4500 și 17000, cu o valoare medie de 11564. În condiții de izotermie, cele mai ridicate valori au fost obținute pe sperma brută cu o medie de 11664; valoarea acesteia a scăzut când s-a lucrat pe spermă după diluare, (cu o medie de 8031).

La vierii din rasa Mangalița s-au întâlnit cele mai mari valori astfel: valoarea medie a spermei brute a fost de 13500 la temperatura de 37°C și de 11000 la temperatura de 25°C; 8666 pe sperma după diluare; și de 7500 după conservarea timp de 24 de ore.

Procentul cel mai mare al fecundității (de 88,09%) s-a obținut la grupa vierilor Pietrain linia RK, unde și valoarea medie a rezistenței spermatozoizilor a fost cea mai mare, la toate categoriile de spermă (13500 la S.B., 11750 la S.D., și 9000 la S.c.).

Considerăm că valoarea rezistenței materialului seminal, influențează valoarea indicilor de reproducție obținuți prin înșămânțarea artificială intrauterină (I.A.I.U.).