تحقیقات تولیدات دامی
سال سوم/ شماره دوم/ تابستان ۱۳۹۳ (۶۸-۶۱)

اثر سطوح آنتی‌بیوتیک‌های مختلف روی کیفیت اسپرم قوچ در طول ذخیره‌سازی در ۵ درجه سانتی‌گراد

پری روستا[۱]، اردشیر محیط[۲*]، محمد روستائی علی‌مهر [۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۲- تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲)

چکیده

به منظور مطالعه‌ی اثر آنتی بیوتیک‌های مختلف روی کیفیت اسپرم قوچ، یک آزمایش فاکتوریل $۲^۳$ در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با ۲ بلوک و ۴ مشاهده در هر واحد آزمایشی انجام شد. عوامل شامل سه آنتی بیوتیک لینکومایسین (L)، جنتامایسین (G) و آمپی‌سیلین (A) بودند که هر یک در دو سطح صفر و به ترتیب ۵، ۱۰ و ۲/۵ µg/ml رقیق کننده مورد استفاده قرار گرفتند، رقیق‌کننده بر پایه تریس به عنوان بلوک اول و رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ به‌عنوان بلوک دوم در نظرگرفته شد. منی از ۴ راس قوچ در ۸ نوبت جمع آوری شد. در هر نوبت نمونه ها تجمیع و به هشت قسمت مساوی تقسیم شدند. به هر قسمت، رقیق‌کننده‌ی متفاوت از نظر سطوح آنتی‌بیوتیک افزوده شد. نمونه ها با سرعت ۰/۲۵ °c/min تا ۵ °c سرد شدند و تا ۷۲ ساعت در همین دما ذخیره شدند. ارزیابی اسپرم در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی انجام شد. اثر متقابل آنتی‌بیوتیک‌ها بر درصد تحرک پیش‌رونده، سلامتی غشا پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم معنی‌دار بود (*P*<۰/۰۵). پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی، درصد تحرک پیش‌رونده (۷۸/۱۹٪، ۶۶/۲۶٪ و ۵۴/۵۲٪)، سلامتی غشا پلاسمایی (۸۵/۱۲٪، ۷۵/۱۲٪ و ۶۲/۶۲٪) و زنده‌مانی اسپرم (۸۶/۱۲٪، ۷۸/۳۸٪ و ۷۰/۶۲٪) در تیمار $a.\ g.\ l_{۱۰}$ (لینکومایسین در سطح ۱۰ µg/ml رقیق کننده) به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها بجز تیمار $a.\ g_۵\ l.$ (جنتامایسین در سطح ۵ µg/ml) بیشتر بود (*P*<۰/۰۵). هر چند در زمان صفر، تیمار $a.\ g.\ l_{۱۰}$ بطور معنی داری از نظر خصوصیات مورد بررسی نسبت به تیمار $a.\ g_۵\ l.$ برتری داشت. از این تحقیق استنتاج می‌شود که استفاده از لینکومایسین در سطح ۱۰ µg/ml رقیق‌کننده، بیشترین اثر را در حفظ کیفیت اسپرم در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد داشته است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بیوتیک، اسپرم، قوچ، ذخیره سازی

نویسندهٔ مسئول: ar_mohit@guilan.ac.ir

مقدمه

لازمه استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی، امکان ذخیره‌سازی مایع منی به صورت مایع و منجمد است (Douard *et al.*, 2004). رقیق‌کننده استفاده شده برای ذخیره‌سازی شامل مقادیر زیادی از مواد مغذی لازم برای ادامه فعالیت اسپرم و زنده‌مانی آن در محیط آزمایشگاهی است. اما این مواد مغذی به باکتری‌ها نیز اجازه رشد می‌دهند (Martnen *et al.*, 2001). به علاوه بخشی از رقیق‌کننده‌های منی شامل افزودنی‌های طبیعی مانند شیر و زرده تخم مرغ هستند که می‌توانند سبب آلودگی منی در حین عمل‌آوری شوند (Schiewe, 1998). در آزمایشات اولیه نشان داده شده است که دوزهای مناسب پنی‌سیلین، استرپتومایسین و پلی-میکسین نه تنها برای کنترل رشد باکتری در مایع منی-هستند، بلکه هیچ اثر منفی بر زنده‌مانی اسپرم ندارند، این محققان دریافته‌اند که افزودن سولفانومید به مایع منی کم بارور لقاح را ۱۰ تا ۱۵٪ بهبود می‌بخشد (Foote and Bratton, 1950).

افزودن آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید و بتالاکتام به رقیق‌کننده منی در سطح اتحادیه ملی اروپا مقرر شده است (Althouse and Skaife, 2010). افزودن آنتی‌بیوتیک‌ها به رقیق‌کننده منی به‌عنوان یک اقدام پیشگیرانه در برابر نفوذ باکتری‌ها به دستگاه تناسلی حیوان ماده است (Salamon and Maxwell, 2000). مشخص شده است که باکتری-های موجود در مایع منی به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و سفتی‌فور حساسیت بیشتری درمقایسه با سایر آنتی-بیوتیک‌ها دارند (Jesos Luis *et al.*,2010). درگونه‌های مختلف حیوانی باکتری‌های مختلف از گونه و جنس‌های مختلف در نمونه‌های منی شناسایی شده‌اند (Akhter *et al.*, 2008). تاکنون ۲۰ گونه از باکتری‌های هوازی که مهمترین آنها اشریشیاکولی، پروتئوس میرابلیس، انتروباکتریا، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و استافیلوکوکوس اورئوس هستند،در منی قوچ شناسایی شده‌اند. مشخص شده است که هر چه تعداد باکتری‌ها کمتر باشد کیفیت منی ذخیره شده بهتراست (Jesos Luis *et al.*, 2010)

بسیاری از میکروب‌ها بیماری‌زا نیستند ولی برای کسب مواد غذایی با اسپرم رقابت نموده و محصولات فرعی متابولیکی تولید می‌کنند که روی قدرت زنده‌مانی و تحرک اسپرم تاثیرات سوئی دارند (Wolff *et el.*, 1993). گروهی از محققان حساسیت باکتری‌های مایع منی را نسبت به چندین آنتی‌بیوتیک بررسی کردند و نشان داده شد که باکتری‌ها به جنتامایسین حساسیت بیشتری نسبت به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (Jesos Luis *et al.*, 2010). به علاوه در آزمایشات Azawil and Ismaeell (2012) گروهی دیگر از آنتی‌بیوتیک‌ها را به مایع منی افزودند و گزارش کردند که بالاترین درصد تحرک مربوط به نمونه‌های مخلوط شده با لینکومایسین است. با توجه به اینکه در آزمایشات قبلی آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و لینکومایسین در کنار یکدیگر مورد مقایسه قرار نگرفته‌اند این آزمایش به مرحله اجرا درآمد تا موثرترین نوع آنتی‌بیوتیک و دوز آن جهت افزودن به رقیق‌کننده اسپرم مشخص شود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش با استفاده از ۴ راس قوچ تالشی با سن ۳ تا ۴ سال و متوسط وزن ۰/۵ ± ۵۰ کیلوگرم در فصل تولیدمثل در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. روزانه ۱۳۰۰g یونجه خشک، ۵۹۰ g جو و ۶۲۰ g کاه برنج در دو وعده خوراک صبح و شب در اختیار دام‌ها قرار گرفت. نمونه‌های منی دو بار در هفته به فاصله دو روز به کمک واژن مصنوعی استریل و در حضور میش فحل جمع‌آوری شد. به منظور ایجاد فحلی دائمی در میش، به مدت ۷ روز سیدر حاوی پروژسترون در واژن میش قرار داده شد. روز برداشت سیدر، ۱ mL وتاسترول (استرادیول بنزوات ۲mg/mL) به صورت عضلانی تزریق شد. یک آزمایش فاکتوریل 2^3 در قالب یک طرح بلوک‌های کامل تصافی با ۴ مشاهده در هر واحد آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت. عوامل شامل سه آنتی بیوتیک لینکومایسین (L)، جنتامایسین (G) و آمپی‌سیلین (A) بودند که هر یک در دو سطح صفر و به ترتیب ۵،۱۰ و ۲/۵ µg/mL رقیق کننده مورد استفاده قرار گرفتند. رقیق‌کننده بر پایه تریس به عنوان بلوک اول و رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ به عنوان بلوک دوم در نظر گرفته شد. در مجموع ۳۲ انزال در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت که طی ۸ نوبت جمع‌آوری شدند. در هر نوبت از هر قوچ یک نمونه انزال جمع‌آوری شد. جهت بررسی اثر آنتی‌بیوتیک ها در رقیق‌کننده تریس (۳/۲۵۸ گرم تریس، ۱/۸۷ گرم سیترات، ۰/۹۳ گرم دی فروکتوز، ۲۰٪ زرده تخم مرغ، pH = ۷، ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر)، انزال های به‌دست آمده از نوبت ۱ تا۴ نمونه‌گیری و جهت بررسی اثر آنتی‌بیوتیک‌ها در رقیق‌کننده شیر پس-

چرخ (۹ گرم شیر پس‌چرخ، ۱/۹۹ گرم اسید سیتریک، ۱ گرم گلوگز و ۵٪ زرده تخم مرغ و تا۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) از انزال‌های به‌دست آمده از نوبت ۵ تا ۸ استفاده شد. منی جمع‌آوری شده از هر قوچ به‌صورت جداگانه به نسبت ۱ به ۱ با رقیق‌کننده مورد نظر مخلوط شد. در دمای ۳۷ درجه به آزمایشگاه منتقل شد و به‌صورت جداگانه از نظر تحرک و غلظت مورد ارزیابی شد. نمونه‌هایی که تحرک بالاتر از۸۰٪ و غلظت بیش از ۳ میلیارد داشتند با هم مخلوط و تا غلظت $۱۰^۶$mL × ۱۶۰۰ رقیق شدند. سپس ۸ میلی‌لیتر از آن برداشته و به ۸ قسمت ۱ میلی‌لیتری تقسیم شدند. هربخش به یک تیمار اختصاص داده‌شد. تیمارها شامل شاهد (a.g.l.)، لینکومایسین در سطح µg/mL۱۰ (a.g.$l_{۱۰}$.)، جنتامایسین در سطح µg/mL۵ ($ga_۵$l.)، لینکومایسین و جنتامایسین به ترتیب در سطوح ۱۰و ۵ µg/mL (a.$g_۵l_{۱۰}$.)، آمپی‌سیلین در سطح µg/mL۲/۵ ($a_{۲/۵}$g.l.)، لینکومایسین و آمپی‌سیلین به ترتیب در سطوح۱۰ و µg/mL۲/۵ ($a_{۲/۵}$g.$l_{۱۰}$.)، آمپی‌سیلین و جنتامایسین به ترتیب در سطوح ۲/۵و µg/mL۵ ($a_{۲/۵}g_۵$l.) و آمپی‌سیلین، جنتامایسین و لینکومایسین به ترتیب در سطوح ۲/۵ ، ۵ و۱۰ µg/ mL ($a_{۲/۵}g_۵l_{۱۰}$.) بودند. سپس هر قسمت به داخل یک سرنگ کشیده شد و سر سوزن به سرنگ متصل شد. با استفاده از پلی ونیل الکل سوراخ سر سوزن مسدود و در ظرف حاوی آب°C ۳۷ در دستگاه سردکننده (Test Chamber EG53AH, KATO, Japan) قرار داده شد. دمای نمونه‌ها به‌صورت تدریجی کاهش داده شد (۰/۲۵°C/min) تا دمای آنها متعادل شود. سپس ارزیابی‌ها در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۴ ساعت بعد از ذخیره‌سازی انجام شد. جهت ارزیابی تحرک ابتدا هر نمونه به غلظت mL / $۱۰^۶$×۵۰ رسانده شد. سپس ۱۰ mL از هر نمونه برداشته و تحرک آن با استفاده از سیستم CASA محاسبه شد (Yániz *et al*., 2008). جهت ارزیابی سلامت غشاپلاسمایی ۵ میکرولیتر از نمونه منی با ۵۰ میکرولیتر از محلول هایپوسمتیک (۰/۷۳۵ گرم سیترات سدیم و۱/ ۳۵۱ گرم فروکتوز در۱۰۰ میلی لیترآب مقطر، pH: ۷) مخلوط و داخل آون بهمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ فاز متضاد (LX 400 Labomed)، ۱۰۰ عدد اسپرم در ۵ میدان دید شمارش شد. اسپرم‌های دارای دم پیچ خورده به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های دارای دم صاف به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی آسیب دیده) در نظرگرفته شدند (Heise *et al*., 2010). به منظور ارزیابی زنده‌مانی ابتدا درون یک میکروتیوب ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم با ۱۰ میکرولیتر از محلول رنگ‌آمیزی ائوزین نگروزین (۰/۶۷ گرم ائوزین Y و۱۰ گرم نگروزین، ۰/۹ گرم کلرید سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) مخلوط شد. بعد از ۳۰ ثانیه، ۵ میکرولیتر از مخلوط نمونه منی و رنگ روی لبه با دمای ۳۷ درجه گذاشته شد و با لام دیگر گسترش تهیه گردید. بعد از خشک شدن یک قطره روغن ایمرسیون لام روی لام گسترش یافته قرار داده شد و تعداد ۲۰۰ عدد اسپرم از ۴ ناحیه مختلف لام شمارش گردید. سلول‌های رنگ نگرفته به عنوان اسپرم‌های زنده و سلول‌های بنفش، به عنوان اسپرم‌های مرده تعیین شدند (Bjorndahle *et al*., 2003).
جهت تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشی از نرم افزار SAS با استفاده از رویه GLM و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به اثرات متقابل آنتی‌بیوتیک‌ها بر درصد تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم در طی زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی در جداول ۱، ۲ و ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که اثر متقابل آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی و زنده مانی اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). به‌نحوی که این خصوصیات با مصرف µg/ml۱۰ لینکومایسین (a.g. $l_{۱۰}$.) در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ با سایرتیمارها تفاوتی معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). هر چند بین مصرف µg/ml ۱۰ لینکومایسین (a.g.$l_{۱۰}$.) و µg/ml ۵ جنتامایسین (a.$g_۵$l.) در صفات مورد بررسی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) که این نتایج با آزمایشات Almond and Poolperm (1996) روی اسپرم خوک و گاو مطابقت دارد. گزارش شده لینکومایسین خاصیت باکتریواستاتیکی دارد که به محل ۵۰S ریبوزوم باکتری‌ها متصل شده و سبب مهار فعالیت پپتیدیل ترنسفراز و در نتیجه مهار ساخت پروتئین می‌شود (Spízek and Rezanka, 2004).

جدول۱- اثرات متقابل آنتی بیوتیک‌ها با سطوح مختلف روی تحرک پیش‌رونده اسپرم () درصد) در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲

Table 1. Antibiotic interactions with different levels on the progressive mobility of sperm (percentage) at 0, 24, 48 and 72 hours after storage

Treatment*	Time 0	Time 24	Time 48	Time 72
$a_0\,g_0\,l_0$	58.04[e]	47.53[f]	35.30[g]	27.22[g]
$a_0\,g_0\,l_{10}$	88.22[a]	78.19 [a]	66.26[a]	54.52[a]
$a_0\,g_5\,l_0$	84.04[b]	75.85[a]	65.68[ab]	54.50[a]
$a_0\,g_5\,l_{10}$	86.43[c]	65.15[b]	55.71[c]	45.34[b]
$a_{2.5}\,g_0\,l_0$	64.37[de]	50.96[e]	41.55[f]	34.71[f]
$a_{2.5}\,g_0\,l_{10}$	67.49[de]	62.26[c]	50.19[de]	41.28[c]
$a_{2.5}\,g_5\,l_0$	67.54[d]	61.10[d]	49.00[e]	40.o7[d]
$a_{2.5}\,g_5\,l_{10}$	75.80[c]	66.33[b]	57.54[bc]	45.8[b]
SEM	0.94	0.91	1.70	0.98

* $a_{2.5}$: 2.5 µg/ml Ampicilin, g_5: 5 µg/ml Gentamicin, l_{10}: 10 µg/ml lincomicin, a_0: 0 µg/ml Ampicilin, g_0: 0 µg/ml Gentamicin, l_0: 0 µg/ml lincomicin.

Different letters within each column indicate significant difference between treatments (*P*<0.05).

همچنین مشخص شده آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به شکل برگشت ناپذیر به زیرواحد ۳۰S ریبوزوم متصل شده و مرحله mRNA-tRNA را متوقف می‌کنند که موجب توقف آغازین ساخت پروتئین می‌شود. این آنتی‌بیوتیک‌ها همچنین سرعت ساخت پروتئین را کاهش داده و اشتباه خوانده شدن RNAm را القاء می‌کنند (Prins *et al.*,1996) که خود نشان‌دهنده موثر بودن این دو آنتی‌بیوتیک، نسبت به سایر تیمارها می‌باشد. در این آزمایش به ترتیب ۱۰µg/ml لینکومایسین، ۵µg/ml جنتامایسین و ۲/۵µg/ml آمپی‌سیلین بیشترین تاثیر را در حفظ خصوصیات اسپرم در طی ذخیره‌سازی داشتند که با نتایج Bielanski (2007) روی اسب مطابقت دارد ولی با نتایج *et* Jesos Luis *al.* (2010) روی خوک مغایر است، که این عدم تطابق می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع و تعداد باکتری‌های موجود در مایع منی باشد و نیز می‌تواند به دلیل تفاوت در سن و گونه حیوانات مورد آزمایش باشد. گزارش شده که تعداد باکتری‌های مایع منی در گروه سنی پیرتر بیشتر است (Ijaz *et al.*, 2012). علاوه بر این گزارش شده است که باکتری های موجود در مایع منی در مناطق مختلف با هم تفاوت دارند (Althouse and Lu, 2005). بنابراین آنتی‌بیوتیک‌های موثره بر آنها می‌تواند فرق داشته باشند. از طرف دیگر تیمار $a_0\,g_5\,l_{10}$ اثرحفاظتی کمتری بر خصوصیات مورد بررسی اسپرم نسبت به تیمارهای $a.g.l_{10}$ و $a.g_5l.$ داشته است که نشان می‌دهد اثرات ترکیبی آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت به اثرات جداگانه آنها در نگهداری کیفیت

اسپرم کمتر است. Almond and Poolperm (1996) نیز گزارش کردند که افزودن آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید به مایع منی گاو موثرتر از ترکیب آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین بوده است. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که نمونه‌هایی که با سطح صفر آنتی‌بیوتیک‌ها تیمار شده بودند زنده‌مانی کمتری نسبت به نمونه‌های تیمار شده با سطح دوم آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (*P*<۰/۰۵). در خصوص تاثیر متقابل آنتی‌بیوتیک‌ها بر زنده‌مانی (جدول۳)، لازم به توضیح است که در تمام زمان‌های ذخیره‌سازی، تیمار لینکومایسین ($a.g.l_{10}$) بطور معنی‌داری دارای زنده‌مانی بیشتری نسبت به سایر تیمارها بجز تیمار جنتامایسین ($a.g_5l.$) بود (*P*<۰/۰۵). در زمان صفر بین تیمارهای جنتامایسین ($a.g_5l.$) و لینکومایسین($a.g.l_{10}$) از نظر زنده‌مانی تفاوت معنی‌دار شد و تیمار لینکومایسین ($a.g.l_{10}$) دارای زنده‌مانی بیشتری بود (*P*<۰/۰۵). حضور باکتری‌ها در مایع منی باعث افزایش تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شود. این احتمال وجود دارد که افزایش تولید ROS، در نهایت سبب کاهش فسفوریلاسیون پروتئین‌های آکسونمال و عدم تحرک اسپرم شوند. این حالت منجر به کاهش سیالیت غشا می‌شود(Fanaee *et al.*, 2009). در این آزمایش نیز تیمار شاهد که فاقد آنتی بیوتیک است دارای تحرک پیشرونده کمتری نسبت به سایر تیمارها می‌باشد (جدول۱). تأثیر متقابل آنتی‌بیوتیک‌ها بر تحرک پیش‌رونده معنی‌دار بود و تیمار لینکومایسین ($a.g.l_{10}$) بطور معنی‌داری در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲

جدول۲- اثرات متقابل آنتی بیوتیک‌ها با سطوح مختلف روی سلامت غشا پلاسمایی اسپرم (درصد)در زمان‌های صفر، ۲۴،۴۸ و ۷۲

Table 2. Antibiotic interactions with different levels on the plasma membrane integrity of sperm (percentage) at 0, 24, 48 and 72 hours after storage

Treatment*	Time 0	Time 24	Time 48	Time 72
$a_0\, g_0\, l_0$	73.25^f	53.8^e	39.75^e	27.00^e
$a_0\, g_0\, l_{10}$	95.37^a	85.12^a	75.12^a	62.62^a
$a_0\, g_5\, l_0$	91.62^b	84.50^{ab}	72.50^a	64.12^a
$a_0\, g_5\, l_{10}$	89.87^{bc}	77.87^b	66.25^b	54.62^b
$a_{2.5}\, g_0\, l_0$	83.25^e	62.25^d	49.50^d	38.75^d
$a_{2.5}\, g_0\, l_{10}$	87.87^{cd}	70.75^c	58.25^c	49.37^b
$a_{2.5}\, g_5\, l_0$	86.00^{de}	69.50^c	58.87^c	46.12^c
$a_{2.5}\, g_5\, l_{10}$	89.80^{bc}	77.37^b	65.87^b	53.12^b
SEM	0.80	1.65	1.46	1.70

* $a_{2.5}$: 2.5 µg/ml Ampicilin, g_5: 5 µg/ml Gentamicin, l_{10}: 10 µg/ml lincomicin, a_0: 0 µg/ml Ampicilin, g_0: 0 µg/ml Gentamicin, l_0: 0 µg/ml lincomicin.

Different letters within each column indicate significant difference between treatments (*P*<0.05).

نسبت به سایر تیمارها بجز جنتامایسین ($a_0g_5l_0$) برتری داشت (P<۰/۰۵). در زمان صفر تحرک پیشرونده در تیمار لینکومایسین ($a_0g_0l_{10}$) بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر از تیمار جنتامایسین ($a_0g_5l_0$) بود. فرضیه دیگر در مورد کاهش قدرت زنده‌مانی اسپرم‌های فاقد آنتی‌بیوتیک این است که H_2O_2 از عرض غشا به داخل سلول انتشار می‌یابد و فعالیت برخی آنزیم‌ها نظیر گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز (G6PD) را مهار می‌کند (Agarwal and Allamaneni, 2011). این آنزیم میزان انتقال گلوکز از طریق هگزوز مونوفسفات را کنترل می‌کند که آن نیز به نوبه خود غلظت داخل سلولی نیکوتین آمید آدنین نوکلئوتید فسفات NADPH را کنترل می‌نماید. NADPH به عنوان منبع الکترون جهت تولید ROS به وسیله سیستم آنزیمی NADPH oxidase مورد استفاده قرار می‌گیرد. مهار G6PD منجر به کاهش NADPH و تجمع گلوتاتیون اکسیده می‌شود که می‌تواند دفاع آنتی‌اکسیدانی اسپرماتوزوا را کاهش داده و پراکسیداسیون فسفولیپید‌های غشا را افزایش دهد (Keshtgar *et al.*, 2012). همچنین سطوح بالای ROS، غشای داخلی و خارجی میتوکندری را متلاشی کرده و باعث القای آزادسازی پروتئین سیتوکروم-C از قسمت بیرونی غشا داخلی میتوکندری به سیتوپلاسم می‌شود که در نهایت باعث فعال‌سازی فاکتور القای آپوپتوز (AIF) می‌شود که آپوپتوز موجب مرگ سلول اسپرم می‌شود (Lee *et al.*, 1997). گزارش شده که آپوپتوز اسپرم بعد از انزال، مسیرهای بیوشیمیایی برای مرگ سلول را نشان می‌دهد که می‌تواند به علت اثرات مستقیم باکتری‌ها (آگلوتیناسیون) یا عوامل متابولیک تولیدی (سم و گونه‌های اکسیژن فعال) رخ دهد (Brock, 1998). نتایج نشان داد که آمپی‌سیلین کمترین اثر را در حفظ کیفیت داشته است که با نتایج Poolperm (1999) روی اسپرم گاو مطابقت داردکه گزارش کرد منی تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین و استرپتومایسین باعث کاهش تحرک اسپرم در ۳ روز بعد از ذخیره‌سازی می‌شوند. وی همچنین گزارش کرد هنگامی که جنتامایسین به نمونه‌ها اضافه می‌شود تحرک آنها به ۶۰ درصد می‌رسد که در تحقیق حاضر نیز تحرک پیش-رونده در تیمارهای دریافت‌کننده لینکومایسین و جنتامایسین، ۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی به‌ترتیب به مقادیر ۵۴/۵۲ و ۵۴/۵۰ درصد رسید. گزارش شده که آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین متعلق به گروه آمینو پنی‌سیلین و آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام است. این آنتی‌بیوتیک توانایی کشتن باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مثل ای‌کولای و سالمونلا را دارد که مانع از رشد باکتری می-شود و از نظر طیف و سطح فعالیت تقریباً معادل آموکسی‌سیلین است (Spízek and Rezanka, 2004). آمپی‌سیلین به عنوان یک مهارکننده رقابتی برای آنزیم ترانس‌پپتیداز است که مانند سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام، سنتز دیواره سلولی را مهار می‌کند که نهایتاً باعث مرگ باکتری می شود (Mayer, 2009). ولی در این آزمایش، استفاده از سطح ۱۰µg/ml لینکومایسین و یا

۵ µg/ml جنتامایسین بهترین اثر را روی کیفیت اسپرم در طی ذخیره‌سازی داشتند. بنابراین حفظ مایع منی برای مدت بیشتر با استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها میسر خواهد بود (Brock,1998). هر چند همانطور که در جداول ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است مشاهده می شود تیمار ۱۰µg/ml لینکومایسین، از نظر صفات مورد بررسی در زمان صفر بصورت معنی‌داری از تیمار ۵ µg/ml جنتامایسین عملکرد بهتری داشته است.

نتیجه گیری نهایی

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش و آنچه که از مقایسه این نتایج با کارهای انجام شده روی سایر دام‌ها بدست آمده است، استنتاج می‌شود که هنگام ذخیره‌سازی در دمای ۵ درجه سانتیگراد اضافه نمودن لینکومایسین در سطح ۱۰µg/ml به منی قوچ در حفظ و نگهداری قدرت تحرک، سلامتی غشا پلاسمایی و زنده‌مانی سلول اسپرم بیشترین اثر را داشته است.

جدول۳- اثرات متقابل آنتی بیوتیک‌ها با سطوح مختلف روی زنده‌مانی اسپرم (درصد) در زمان‌های صفر، ۲۴،۴۸ و۷۲

Table 3. Antibiotic interactions with different levels on the viability of sperm (percentage) at 0, 24.48 and 72 hours after storage

Treatment*	Time 0	Time 24	Time 48	Time 72
$a_0\,g_0\,l_0$	73.25[f]	62.25[e]	48.50[e]	34.62[f]
$a_0\,g_0\,l_{10}$	95.37[a]	86.12[a]	78.38[a]	70.62[a]
$a_0\,g_5\,l_0$	91.62[b]	84.25[ab]	76.50[ab]	70.37[a]
$a_0\,g_5\,l_{10}$	89.87[bc]	80.37 [abc]	70.75[bc]	64.00[b]
$a_{2.5}\,g_0\,l_0$	83.25[e]	70.17[d]	58.25[d]	46.62[e]
$a_{2.5}\,g_0\,l_{10}$	87.87[cd]	67.12[cd]	65.37[cd]	57.12[cd]
$a_{2.5}\,g_5\,l_0$	86.oo[de]	76.12[cd]	64.37[cd]	54.62[d]
$a_{2.5}\,g_5\,l_{10}$	90.37[bc]	77.62[bc]	70.37[bc]	62.65[bc]
SEM	0.89	1.80	1.70	1.46

* $a_{2.5}$: 2.5 µg/ml Ampicilin, g_5: 5 µg/ml Gentamicin, l_{10}: 10 µg/ml lincomicin, a_0: 0 µg/ml Ampicilin, g_0: 0 µg/ml Gentamicin, l_0: 0 µg/ml lincomicin.

Different letters within each column indicate significant difference between treatments (P<0.05).

فهرست منابع

Agarwal A. and Allamaneni S. S. 2011. Free radicals and male reproduction. Indian Medical Assocation, 109(3): 184-187.

Akhter S., Ansari M. S., Andrabi S. M., Ullah N. and Qayyum M. 2008. Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (Bubalusbubalis) bull semen. Reproduction in Domestic Animals, 43: 272–278.

Almond G. and Poolperm P. 1996. Semen contamination and choosing antibiotics. In: Proceedings of North Carolina Healthy Hogs Seminar p: 1–3.

Althouse G. C. and Lu K. G. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. Theriogenology, 63: 573–584.

Althouse G. C. and Skaife P. 2010. Loomis prevalence and types of contaminant bacteria in extended, chilled equine semen. Animal Reproduction Science, 121: 224–225.

Azawi1 O. I. and Ismaeel A. 2012. Influence of addition of different antibiotics in semen diluent on viable bacterial count and spermatozoal viability of awassi ram semen. Veterinary, 52: 75-77.

Bielanski A. 2007. Disinfection procedures for controlling microorganisms in thesemen and embryos of humans and farm animals.Theriogenology, 68: 1–22.

Bjorndahle L., Sonderlund I. and Kvist U. 2003. Evaluation of the on-step eosin-nigrsinstatining technique for human sperm vitality assessment. Human Reproduction, 18: 813-816.

Brock K. 1998. Quality control for materials of animal origin used in embryo production and transfer. In: Stringfellow DA, Seidel M, editors. Manual of the International EmbryoTransfer Society. USA: IETS, Savoy, Illinois, 9-135.

Douard V., Hermier D., Magistrini M. L., Abbe C. and Blesh E. 2004. Impact of changes incomposition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology, 61: 1-13.

Fanaee H., Keshtgar S., Bahmanpour S., Kazeroni M., Ghannadi A. R. and Rostami S. 2009. Effects of α-tocopherol and A23187 on normozoosperm motility and vitality. Iranin Journal of reproductive medicine, 7 (Suppl. 2): 53.

Foote R. H. and Bratton R. W.1950. The fertility of bovin semen in extenders containing sulfanilamide, penicillin, streptomycin and polymyxin. Journal of Dairy Science, 33(8): 544-547.

Heise A., Kähn W ., Volkmann D. H., Thompson P. N. and Gerber D. 2010. Influence of seminalplasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. Animal Reproduction Science, 118: 48-53.

Ijaz A., Laeeq A. L., Zafariqbal Q., Najibur R. and Iqbal M. 2011. Effect addition antibiotic on liveability index and viable bacterial count of lohi ram semen. Agriculture and Biology, 4: 300-302.

Jesos Luis Y., Mara A., Marco A. and Pilar S. 2010. Bacterial contamination of ram semen antibiotic sensitivities،and effect on sperm quality during storage at 15 ◦C. Animal Reproduction Science, 122 : 142–149.

Keshtgar S., Fanaei H., Bahmanpour S. F., Azad A., Ghannadi D. and Kazeroni M. 2012. In vitro effects of alpha-tocopherol on teratozoospermic semen samples. Andrologia, 44 (Suppl 1): 721-727.

Lee J., Richburg J. H., Younkin S. C. and Boekelheide K. 1997. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. Endocrinology, 138: 2081-2088.

Martnen E. A., Vazquez J. M., Roca J., Lucas X., Gil M. A., Parrilla I., Vazquez J. L. and Day N. 2001. Succesful non-surgical deep intrauterine insemination with small number of spermato- zoa in sows. Reproduction, 122: 289–296.

Mayer G. 2009. Microbiology and Immunology. Chapter 20. University of South Carolina School of Medicine, p:1-20. USA.

Poolperm P. 1999. Shelf life of semen extended with antibiotics. In: Proceedings of North Carolina Healthy Hogs Seminar.p:1–5.

Prins J. M., Weverling G. J., de-Blok K.,van-Ketel R. J. and Speelman P. 1996. Validation and nephrotooxicity of a simplified once-daily aminoglycoside dosing schedule and guidelinesfor monitoring therapy. Antimicrobial Agents Chemother, 40 (11): 2494–2499.

Salamon S. and Maxwell M. C. 2000. Storage of ram semen. Animal Reprodaction Science, 62: 77–111.

Schiewe M. 1998. General hygiene and quality control practices in a embryo production laboratory. In: Stringfellow DA, Seidel M, editors. Manual of the International Embryo Transfer Society. USA: IETS, Savoy, Illinois, 93–103.

Spízek J. and Rezanka T. 2004 Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. Appied Microbiology and Biotechnology, 63 (5): 510–519.

Wolff H., Panhans A., Stolz W. and Meurer M. 1993. Adherence of Escherichia coli to sperm a mannose phenomenon leading to agglutination sperm and E. coli. Fertility, 60: 154–158.

Yaniz J., MartiJ I., Slivestre M. A., Folch J., Santolaria P., Alabart J. L. and Lopez-Gatius F. 2008. Effect of solid storage of sheep spermatozoa at 15 ◦C on their survival and penetrating capacity. Theriogenology, 64: 1844–1851.

Effect of different levels of antibiotics on ram spermatozoa quality during storage at 5℃

P. Rousta [1], A. Mohit [2*], M. Roostaei-Ali Mehr [3]
1. MS Graduated Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan
2. Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan
3. Associate professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan

(Received: 2-3-2013- Accepted: 23-11-2013)

Abstract

Experiment was conducted to study the effect of different antibiotics on sperm quality of ram by a completely randomized block design using 2^3 factorial arrangement with 2 block and 4 observations in each experimental units. Factors include three antibiotics named Gentamycin (G), Lincomycin (L) and Ampicillin (A) that were used at two different levels including zero and, respectively 5, 10 and 2.5 μg / ml of diluents. Tris-based and skimmed milk-based diluents were considered as block1 and block2 respectively. Semen was collected from four rams in 8 times. Samples were aggregated and divided into eight equal parts. The different levels of antibiotics were added to each part. Samples temperature was reduced at a rate of 0.25° C/min to5° C and was stored at this temperature for 72 hours. Sperms evaluations were performed at 0, 24, 48 and 72 h after storage. The interactions between antibiotics on the progressive mobility, plasma membrane integrity and viability of sperm were significant (P<0.05).After 0,24,48 and 72h of storage, progressive motility(78.19%, 66.26% and 54.52%), plasma membrane integrity(85.12%,75.12% and 62.62%) and viability of sperm(86.12%,78.38% and 70.62%) in $a_0g_0l_{10}$ (Lincomycin 10μg / ml of diluents) were significantly (P<0.05) higher than other treatments except $a_0g_5l_0$ (Gentamycin 5μg / ml of diluents) at 24, 48 and 72 h after storage. However the characteristics of $a_0g_0l_{10}$were significantly higher than $a_0g_5l_0$ at time zero. From this study we concluded that using Lincomycin 10μg / ml had the most effect on quality of spermatozoa during storage at 5° C.

Key words: Antibiotics, Spermatozoa, Ram, Storage

*Corresponding author: ar_mohit@guilan.ac.ir