

Invenția se referă la zootehnie, și anume la medii de protecție a spermei de berbeci și poate fi aplicată pentru diluarea, conservarea prin refrigerare și păstrarea materialului seminal, ce va contribui la studierea și utilizarea eficientă a genofondului animal autohton de interes științific și practic.

O importanță deosebită în cadrul biotehnologiilor de reproducție îl ocupă metodele de conservare, în special mediile de protecție, care servesc pentru diluarea, conservarea și păstrarea spermatozoizilor, în vederea asigurării calității înalte a materialului seminal.

Tehnicile de conservare a spermei de berbeci la temperatura de refrigerare sunt cele mai utilizate la aceste animale, deoarece nu necesită echipament special și asigură calitatea materialului seminal la nivel acceptabil. Mediile de protecție au menirea de a optimiza concentrația spermatozoizilor în probe, a păstra viabilitatea, mobilitatea și capacitatea lor fecundantă înaltă pe durata conservării și stocării la temperaturi joase. De regulă, pentru menținerea acestor indici la nivel înalt, mediile de protecție conțin diverse substanțe protective și antioxidante cu rol de susținere a metabolismului spermatozoizilor și protecție față de formele reactive de oxigen și radicalii liberi, care prin deteriorarea membranelor, provoacă moartea spermatozoizilor, implicit diminuarea calității materialului spermatic.

Actualmente, unele dintre cele mai intens utilizate în acest scop substanțe sunt gălbenușul de ou și citratul de sodiu, care au efecte benefice asupra viabilității și mobilității spermatozoizilor pe durata conservării și păstrării materialului seminal prin refrigerare, timp de maxim 48 ore.

Cea mai apropiată soluție a protocolului de conservare prin refrigerare a spermei de berbec este utilizarea unui mediu de protecție compus din, % vol.: glucoză 0,8, citrat de sodiu 2,8, gălbenuș de ou 25, antibiotice 50 000 UI, apa bidistilată restul, care permite păstrarea materialului seminal pe o perioadă de 24-48 de ore, menținând mobilitatea spermatozoizilor la un nivel de 70-80 % (minimal admisibil pentru utilizare) față de cea inițială [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în durata foarte mică de păstrare a materialului seminal diluat și refrigerat, de maxim 48 ore și indicii microbiologici (numărul total de germeni - NTG ce include bacterii și fungi patogeni) înalți ai probelor. Acest fapt reduce esențial calitatea materialului spermatic și perioada posibilă de utilizare a materialului spermatic, ce duce la pierderi semnificative de material genetic valoros, deoarece materialul seminal refrigerat poate fi inoculat la femele numai în perioada de călduri a ciclului sexual.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unui mediu de protecție pentru diluarea și conservarea prin refrigerare a materialului seminal, obținut de la berbecii reproducători de mare valoare zootehnică, care să asigure majorarea numărului de spermatozoizi mobili și celor cu mișcare rectilinie, diminuarea indicilor microbiologici și păstrarea mai îndelungată a materialului genetic (până la 120 ore), protejând spermatozoizii împotriva stresului asociat cu temperaturile joase și influența negativă a microorganismelor patogene.

Esența invenției constă în aceea că se propune un mediu de protecție pentru conservarea prin refrigerare a spermei de berbec, care conține, % vol.: zaharoză 6,4, citrat de sodiu 0,6, gălbenuș de ou 10, soluție apoasă de 500 mg/ml de manoproteine 0,6-0,8 și apă bidistilată restul.

Efectul pozitiv este cauzat de introducerea în componența mediului de protecție a zaharozei și a preparatului manoproteic biologic activ, obținut din biomasa de levuri din deșeurile industriei de bere, care protejează spermatozoizii de influența speciilor reactive de oxigen și a radicalilor liberi, asigurând integritatea membranelor, păstrează mobilitatea spermatozoizilor pe o durată mai lungă de stocare și reduc semnificativ indicii microbiologici ai probelor.

Rezultatul tehnic al invenției constă în prelungirea duratei de stocare a spermei diluate și refrigerate până la 120 ore, numărul de spermatozoizi mobili (SM) fiind de 66,3-68,0%, iar a celor cu mișcare rectilinie (SMR) de 18,5-25,3% în funcție de concentrația preparatului manoproteic, ce este cu 27,5-30,8% și respectiv 48,0-102,2% mai mult comparativ cu cea mai apropiată soluție (tabelul 1) și diminuarea titrului microorganismelor patogene cu 11,8-49,1% în cazul concentrației 0,6 % vol. și cu 19,6-100% la utilizarea concentrației de 0,8% vol., față de valoarea de referință (tabelul 2).

Implementarea invenției va permite:

- majorarea duratei de păstrare a materialului genetic la temperatura de +2 -+4°C de 2,5 ori;
- utilizarea eficientă și rațională a materialului seminal al reproducătorilor valoroși;
- optimizarea metodelor de conservare și utilizare a materialului genetic valoros.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Se cântăresc 6,4 g de zaharoză și 0,6 g de citrat de sodiu, se dizolvă în apă bidistilată (50 ml) într-o colbă de sticlă volumetrică (100 ml), rezistentă la temperaturi înalte. Soluția obținută se sterilizează timp de 30 de minute la temperatura de 100°C la baie de apă. Ulterior, soluția se răcește până la temperatura de 38°C, se adaugă 10 ml de gălbenuș de ou și 0,6-0,7 ml preparat manoproteic, ce reprezintă o soluție apoasă de 500 mg/ml de manoproteine. Volumul mediului de protecție obținut se aduce cu apă bidistilată până la 100 ml.

Materialul seminal se introduce în mediul de protecție reieșind din 50-100 milioane de spermatozoizi vii per doză (0,2 ml). Probele se stochează pentru păstrare în camera frigorifică la temperatura de +2 -+4°C pe o durată de până la 120 de ore.

Procedul de obținere a preparatului manoproteic din biomasa de levuri de bere

Se centrifughează biomasa de levuri din deșeurile industriei de bere cu scopul eliminării lichidului remanent și se congelează la temperatura de -18°C pentru păstrare. Ulterior, biomasa de levuri de bere decongelată (30 g) se

amestecă cu 30 ml de soluție tampon fosfat de sodiu, pH 7,8 (raport 1:1). Suspensia obținută se supune autolizei la +37°C sau +45°C timp de 8 ore, cu agitare periodică. După autoliză suspensia se supune centrifugării la 3500 rot/min timp de 15 minute, sedimentul restant după centrifugare se tratează cu soluție 1N NaOH (raport 1:5) la temperatura de +80±5°C timp de 2 ore. După hidroliză suspensia este supusă centrifugării la 3500 rot/min timp de 15 minute. Supernatantul alcalin obținut se sedimentează cu alcool etilic de 96% în raport de 1:2. La sedimentare cu alcool se formează fulgi de culoare alb-bej cu consistență vâscoasă care și reprezintă manoproteinele. Lichidul și sedimentul se separă. Din sediment se obține preparatul manoproteic de concentrația necesară prin amestecarea cu apă distilată și se ajustează pH-ul până la 7,0.

Preparatul manoproteic reprezintă o soluție apoasă de 500 mg/ml de manoproteine, conținând aminoacizi esențiali 0,24 mg/ml, aminoacizi imunoactivi 0,33 mg/ml, macroelemente 4,30 mg/ml (K; P; Na; Mg; Ca), microelemente 2,20 μg/ml (Fe; Al; Mn; Cu; Cr; Mo; Ni; Co; Zn; Se; Ag), posedă activitate antioxidantă totală de 2,9±0,15 mg trolox echivalent 100 mg B/m și a enzimelor antioxidante catalaza (CAT) și superoxid-dismutaza (SOD) de 741,2±44,8 mmol/min la mg proteină și, respectiv, 66,2±2,9 U/mg proteină.

În varianta martor, după 120 de ore de păstrare, numărul de spermatozoizi mobili (SM) este de 52,0%, a celor cu mișcare rectilinie (SMR) de 12,5%, iar în mediul revendicat acești indici sunt cu 27,5-29,8 și respectiv 48,0-78,4% mai mari decât valoarea de referință. În același timp, titrul microorganismelor patogene în varianta martor variază la nivel de 5,1-5,9 log₁₀UFC/ml, iar în mediul revendicat este cu 11,8-49,1% mai mic față de martor.

Exemplul 2

Se cântăresc 6,4 g de zaharoza și 0,6 g de citrat de sodiu, se dizolvă în apă bidistilată (50 ml) într-o colbă de sticlă volumetrică (100 ml), rezistentă la temperaturi înalte. Soluția obținută se sterilizează timp de 30 de minute la temperatura de 100°C la baia de apă. Ulterior, soluția se răcește până la temperatura de 38°C, se adaugă 10 ml gălbenuș de ou și 0,8 ml preparat manoproteic. Volumul mediului de protecție obținut se aduce cu apă bidistilată până la 100 ml.

Materialul seminal se introduce în mediul de protecție reieșind din 50-100 milioane de spermatozoizi vii per doză (0,2 ml). Probele se stochează pentru păstrare în camera frigorifică la temperatura de +2 -+4 °C pe o durată de până la 120 de ore.

În varianta martor, după 120 de ore de păstrare, numărul de spermatozoizi mobili (SM) constituie 52,0%, a celor cu mișcare rectilinie (SMR) 12,5% din valoarea inițială, iar în mediul revendicat acești indici sunt cu 30,8% și respectiv 102,2% mai mari decât valoarea de referință. În același timp, titrul microorganismelor patogene în varianta martor variază la nivel de 5,1-5,9 log₁₀UFC/ml, iar în mediul revendicat este cu 19,6-100% mai mic față de martor.

Tabelul 1

Indicii de mobilitate a spermatozoizilor inițial și după 120 de ore de păstrare pe diferite medii de protecție la temperatura de +2-+4°C

Mediul protector	După diluare				La 120 ore de stocare				
	SM, % inițial	SM, % la martor	SMR, % inițial	SMR, % la martor	SM, % din inițial	SM, % la martor	SMR, % din inițial	SMR, % la martor	
Mediul martor	81,3±4,6	100	39,3±2,3	100	52,0±6,0	100	12,5±3,0	100	
Mediul revendicat	+0,6%	91,8±0,8	112,9	51,8±2,9	131,8	66,3±5,8	127,5	18,5±6,0	148,0
	+0,7%	92,5±1,3	113,8	51,8±2,2	131,8	67,5±4,6	129,8	22,3±7,6	178,4
	+0,8%	92,5±1,3	113,8	51,8±2,9	131,8	68,0±5,8	130,8	25,3±7,7	202,4

Tabelul 2

Indicii microbiologici ai probelor după 120 de ore de păstrare pe diferite medii de protecție la temperatura de +2-+4°C

Tulpini	Mediul martor		Mediul revendicat +0,6%		Mediul revendicat +0,8%	
	Titrul, log ₁₀ UFC/ml	%	Titrul, log ₁₀ UFC/ml	% la martor	Titrul, log ₁₀ UFC/ml	% la martor
NTG	5,8	100	5,1	87,9	3,9	67,2
<i>E.coli</i>	5,1	100	4,5	88,2	4,1	80,4
<i>Clostridium spp.</i>	5,5	100	4,7	85,5	0	-
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5,9	100	4,4	74,6	0	-
<i>Bacillus spp.</i>	5,3	100	4,1	77,4	4,1	77,4
<i>Fungi</i>	5,5	100	2,8	50,9	2,8	50,9

Rezultatele au fost obținute în cadrul proiectului 20.80009.5107.16 „Preparate microbiene biologic active noi pentru majorarea potențialului reproductiv și productiv al animalelor de interes zootehnic”, finanțat de ANCD.