

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Inhibice mikroorganismů ve vzorcích
spermatu chovných kanců

Bc. Jitka Kubásková

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jitka Kubásková**
Osobní číslo: **C15617**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Inhibice mikroorganismů ve vzorcích spermatu chovných kanců**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Charakterizujte vlastnosti kančího spermatu.
2. Zaměřte se na mikroorganismy, které jsou nejčastěji prokazovány ve vzorcích spermatu chovných kanců.
3. Uveďte, jaký mají mikroorganismy vliv na kvalitu kančího spermatu.
4. Shrňte možnosti, kterými lze ovlivnit mikroorganismy ve vzorcích spermatu.

Experimentální část:

1. Vyšetřete vzorky spermatu chovných kanců, které jsou ředěny různými druhy ředících látek.
2. Vyhodnoňte výsledné působení ředících látek.
3. Výsledky porovnejte s literaturou.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Markéta Vydržalová, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

28. listopadu 2016

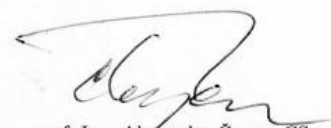
Termín odevzdání diplomové práce:

12. května 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2017

Bc. Jitka Kubásková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Markétě Vydržalové, Ph.D za její trpělivost, vstřícnost, cenné rady, odborné vedení a za čas strávený při tvorbě této práce. Rovněž děkuji oddělení Chovu prasat v Kostelci nad Orlicí za realizaci experimentu.

Na závěr děkuji svým rodičům a příteli, kteří mi byli velkou oporou po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá účinností různých druhů inhibičních látek na mikroorganismy přirozeně kontaminující vzorky spermatu chovných kanců. Zmíněna je také charakteristika a vlastnosti kančího spermatu. Dále je pozornost věnována výskytu mikroorganismů v kančím spermatu, jejich vlivu na kvalitu spermatu a možnostem ovlivnění těchto mikroorganismů ve vzorcích spermatu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kančí sperma, ejakulát, spermie, mikroorganismy, kontaminace, odběr kančího spermatu, ředidla kančího spermatu

TITLE

Inhibition of microorganisms in semen of breeding boars

ANNOTATION

This master`s thesis deals with effect of diverse inhibition substances on semen of breeding boars. It mentioned the characterization and properties of boar semen. Attention is paid to the occurrence of microorganisms in boar semen, their impact on the quality of boar semen and the possibility of influencing microorganisms in semen samples.

KEYWORDS

Boar semen, ejaculate, spermatozoa, microorganisms, contamination, boar semen collection, boar semen extenders

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|---------------------|---|
| ATP | adenosintrifosfát |
| BSA | hovězí sérový albumin (bovine serum albumin) |
| BTS | Beltsville Thaw Solution |
| CFU | počet jednotek tvořících kolonie (colony forming unit) |
| DGC | centrifugace v hustotním gradientu (density gradient centrifugation) |
| <i>E.</i> | <i>Escherichia</i> |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| GIT | gastrointestinální trakt |
| MALDI-TOF MS | hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) |
| MBC | minimální baktericidní koncentrace |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |
| SLC | jednovrstevná centrifugace (single layer centrifugation) |
| sp. | druh (species) |
| spp. | druhy |

Obsah

| | |
|--|-----------|
| SEZNAM OBRÁZKŮ | 11 |
| SEZNAM TABULEK | 11 |
| SEZNAM GRAFŮ | 12 |
| ÚVOD..... | 13 |
| 1. TEORETICKÁ ČÁST..... | 14 |
| 1.1 Vlastnosti kančího spermatu | 14 |
| 1.1.1 Složení kančího spermatu | 14 |
| 1.1.2 Fyzikální vlastnosti kančího spermatu | 16 |
| 1.1.3 Chemické vlastnosti kančího spermatu | 18 |
| 1.2 Mikroorganismy ve vzorcích spermatu chovných kanců..... | 20 |
| 1.2.1 Zdroje kontaminace..... | 20 |
| 1.2.2 Nejčastěji se vyskytující mikroorganismy v kančím spermatu | 21 |
| 1.2.3 Charakteristika nejčastěji se vyskytujících mikroorganismů | 22 |
| 1.3 Vliv mikroorganismů na kvalitu kančího spermatu | 26 |
| 1.4 Inhibice mikroorganismů v kančím spermatu | 29 |
| 1.4.1 Ředění a konzervace kančího spermatu | 29 |
| 1.4.2 Antibiotika v ředidlech kančího spermatu | 31 |
| 1.4.3 Alternativa k antibiotikům v ředidlech kančího spermatu | 34 |
| 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 38 |
| 2.1 Vyšetřovaný materiál | 38 |
| 2.2 Testované látky | 38 |
| 2.3 Přístroje a pomůcky | 38 |
| 2.4 Příprava kultivačních médií a roztoků | 39 |
| 2.5 Stanovení účinnosti inhibičních látek | 40 |
| 3. VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 44 |
| 3.1 Působení BTS ředidla a thiosíranu sodného..... | 44 |
| 3.2 Působení BTS ředidla a koloidního zinku..... | 47 |
| 3.3 Působení BTS ředidla a kyseliny gallové..... | 50 |
| 3.4 Působení BTS ředidla a medu | 54 |
| 3.5 Působení ředidel Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS | 57 |
| 3.6 Působení ředidel Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS | 59 |
| 3.7 Působení ředidel Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS | 61 |
| 3.8 Působení ředidel Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS | 63 |

| | |
|--|-----------|
| 3.9 Působení antibiotik..... | 65 |
| 3.10 Působení ředidel BTS, koncentrát 1 a 2, VIP 3, BIO PIG, M III, OPTIM, SCP | 67 |
| 3.11 Působení ředidel BTS, koncentrát 1 a 2, VIP 3, BIO PIG, M III, OPTIM, SCP | 69 |
| 4. ZÁVĚR..... | 71 |
| 5. SEZNAM POUŽITÉ LITARATURY..... | 73 |
| 6. PŘÍLOHY..... | 83 |

Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Pracovní postup a vybrané hygienické kritické kontrolní body při zpracování kančího spermatu (Schulze a kol., 2015)..... | 21 |
| Obrázek 2: Aglutinace spermií způsobená bakteriální kontaminací (Kuster, Althouse, 2016) | 27 |
| Obrázek 3: Kančí spermie a bakterie <i>Pseudomonas sp.</i> (Kuster a Althouse, 2016) | 28 |
| Obrázek 4: Jednovrstvá centrifugace ejakulátu s použitím Androcoll-E (Morrell, Wallgren, 2011) | 35 |
| Obrázek 5: Příprava ředící řady | 40 |

Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Složení krátkodobých a dlouhodobých ředidel používaných pro kančí sperma (Vyt, 2007) | 31 |
| Tabulka 2: Rizika a výhody používání antibiotik v ředidlech spermatu (Morrell, 2016) | 32 |
| Tabulka 3: Složení testovaných ředidel Tekutý koncentrát ředidla, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Androhep, BTS, Vitasem LD..... | 42 |
| Tabulka 4: Složení testovaných ředidel Tekutý koncentrát 1 a 2, BIO PIG, OPTIM, SCP, M III | 43 |
| Tabulka 5: Složení vzorků kančího spermatu č. 1 | 45 |
| Tabulka 6: Složení vzorků kančího spermatu č. 2 | 47 |
| Tabulka 7: Složení vzorků kančího spermatu č. 3 | 51 |
| Tabulka 8: Složení vzorků kančího spermatu č. 4..... | 54 |
| Tabulka 9: Antibakteriální aktivita čistého medu, gentamycinu, tetracyklinu (Al-Naama, 2009) | 56 |
| Tabulka 10: Složení vzorků kančího spermatu č. 5 | 57 |
| Tabulka 11: Složení vzorků kančího spermatu č. 6 | 59 |
| Tabulka 12: Složení vzorků kančího spermatu č. 7 | 61 |
| Tabulka 13: Složení vzorků kančího spermatu č. 8 | 63 |
| Tabulka 14: Složení vzorků kančího spermatu č. 9 | 65 |
| Tabulka 15: Složení vzorků kančího spermatu č. 10 | 67 |
| Tabulka 16: Složení vzorků kančího spermatu č. 11 | 69 |

Seznam grafů

| | |
|--|----|
| Graf 1: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 1 – 1. den | 46 |
| Graf 2: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 1 – 2. den | 46 |
| Graf 3: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 1 – 3. den | 46 |
| Graf 4: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 2 – 1. den | 48 |
| Graf 5: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 2 – 2. den | 48 |
| Graf 6: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 2 – 3. den | 48 |
| Graf 7: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 3 – 1. den | 52 |
| Graf 8: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 3 – 2. den | 52 |
| Graf 9: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 3 – 3. den | 52 |
| Graf 10: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 4 – 1. den | 55 |
| Graf 11: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 4 – 2. den | 55 |
| Graf 12: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 4 – 3. den | 55 |
| Graf 13: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 5 – 1. den | 58 |
| Graf 14: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 5 – 3. den | 58 |
| Graf 15: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 5 – 7. den | 58 |
| Graf 16: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 6 – 1. den | 60 |
| Graf 17: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 6 – 3. den | 60 |
| Graf 18: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 6 – 7. den | 60 |
| Graf 19: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 7 – 1. den | 61 |
| Graf 20: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 7 – 3. den | 62 |
| Graf 21: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 7 – 7. den | 62 |
| Graf 22: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 8 – 1. den | 63 |
| Graf 23: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 8 – 3. den | 64 |
| Graf 24: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 8 – 7. den | 64 |
| Graf 25: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 9 – 1. den | 66 |
| Graf 26: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 9 – 2. den | 66 |
| Graf 27: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 9 – 3. den | 66 |
| Graf 28: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 10 – 1. den | 68 |
| Graf 29: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 10 – 3. den | 68 |
| Graf 30: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 10 – 7. den | 68 |
| Graf 31: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 11 – 1. den | 70 |
| Graf 32: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 11 – 3. den | 70 |
| Graf 33: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 11 – 7. den | 70 |

ÚVOD

Pro reprodukci chovných prasat je nejčastěji využívána metoda umělé inseminace. Jednou z výhod umělé inseminace je redukce šíření nemocí vyloučením styku a přepravy prasat za účelem oplodnění. Přesto i umělá inseminace je jedním ze způsobů, při kterém se mohou patogeny snadno šířit. Proto jsou samci testováni před vstupem do chovného programu a také v průběhu období odběru spermatu.

Sperma je ideální prostředí pro růst mnoha mikroorganismů, a to nejen bakterií, ale i plísní. Zdrojem kontaminace spermatu může být nejen infekce urogenitálního traktu kanců, ale ke kontaminaci může dojít také během odběru či zpracování spermatu. Velké procento bakteriálních kmenů detekovaných v kančím spermatu patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Většina těchto kmenů není považována za primární patogeny kanců.

Kontaminace kančího spermatu představuje zdroj potencionálního přenosu patogenů na vnímavé samice. Bakteriální kontaminace je důležitý ukazatel kvality kančího spermatu používaného k inseminaci. Kontaminace kančího spermatu obvykle zhoršuje jeho kvalitu. Přítomnost bakterií v kančím spermatu bývá obecně spojena s aglutinací spermií, sníženou životností spermií a sníženou plodností. Dále může být přítomností některých bakterií ve vysoké koncentraci ovlivněna integrita akrozomu, osmotická rezistence nebo pH. Kontaminace kančího spermatu může způsobit u samice neplodnost kvůli vzniku endometritidy, embryonální či fetální smrt a další onemocnění a infekce.

Aby se zabránilo přenosu patogenů na samice, používají se ředidla spermatu s přísadkou antibiotik. Přidání antibiotik ve vhodné koncentraci zlepšuje přežití spermií a také zlepšuje výsledky plodnosti. Antibiotika však mohou být pro spermie toxická, proto jsou hledána různá alternativa. Mezi která patří například použití fyzického odstranění bakterií metodami koloidní centrifugace či použití různých přírodních inhibičních látek místo antibiotik v ředidlech spermatu. K odstranění bakterií lze také využít antimikrobiálních vlastností kovů, které mohou být přidány do ředidel kančího spermatu.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Vlastnosti kančího spermatu

1.1.1 Složení kančího spermatu

Sperma (ejakulát) je biologická tekutina obsahující 3-7 % spermií a 93-97 % semenné plazmy. Semenná plazma je tvořena asi 3 % sekretu nadvarlat, 20 % sekretu semenných váčků, 15 % sekretu bulbouretrálních žláz a 62 % sekretu prostaty a uretrálních žlázek (Říha a kol., 2003). Při ejakulaci kanců je sperma vylučováno v několika frakcích (Yeste, 2008; Casas, 2010; Fàbrega, 2012; Sancho a Vilagran, 2013):

- Prespermiová frakce: je tvořena sekrety, které jsou produkovány prostatou, semennými váčky nebo bulbouretrálními žlázami. Tato frakce zvlhčuje a čistí močovou trubici pro následující průchod spermií. Má objem okolo 10 – 15 ml a normálně neobsahuje spermie.
- Spermiová frakce: objem této frakce se pohybuje mezi 70 – 100 ml. Je tvořena hlavně sekrety prostaty a semenných váčků. Obsahuje vysoké koncentrace spermií, a to $0,5 - 1 \times 10^9$ spermií/ml (tj. 80 – 90% všech ejakulovaných spermií) a má mléčný vzhled. Tato frakce je využívána pro umělou inseminaci prasat.
- Postspermiová frakce: obsahuje nízkou koncentraci spermií (10^6 spermií/ml). Skládá se přibližně ze 150 – 200 ml sekretů z prostaty, semenných váčků a bulbouretrálních žláz. Obsahuje velké množství semenné plazmy, která působí jako aktivátor spermií.

Spermie

Spermie jsou tvořeny v semenotvorných kanálcích varlete kance. Proces tvorby spermií je označován jako spermatogeneze a probíhá kontinuálně po celé reprodukční období života kance. Spermii tvoří hlavička a bičík. Délka spermie se pohybuje okolo 60 μm (Říha a kol., 2003).

Bičík se skládá z centriolového oddílu, mitochondriálního aparátu, axiálních vláken tvořících spojovací část a hlavního oddílu zakončeného terminální částí bičíku (Gramčík a kol., 1976). Spojovací část bičíku zajišťuje tvorbu energie a její následnou přeměnu na energii mechanickou. Tím je umožněn pohyb spermie v tekutém prostředí, který je potřebný k vyhledání a oplodnění vajíček (Říha a kol., 2003; Eddy, 2006).

Základ hlavičky tvoří vysoce kondenzované jádro a akrozom s enzymy, které slouží k rozpuštění obalů kolem vajíček a k penetraci spermie do vajíčka (Říha a kol., 2003; Eddy, 2006). Akrozom představuje velmi labilní systém, který je snadno poškozen při patologických procesech v pohlavním ústrojí, ale také při náhlých změnách osmotického tlaku, pH, teploty prostředí a při procesech ředění a konzervace kančího spermatu (Kliment a kol., 1989).

Cytoplazmatická membrána, která pokrývá celý povrch hlavičky i bičíku, zajišťuje ochranu spermii proti nepříznivým vnějším podmínkám po ejakulaci a udržuje stálost jejich vnitřního prostředí (Říha a kol., 2003). Obsahuje fosfolipidy, které u kančích spermii tvoří asi 70 % obsahu všech lipidů (Eddy, 2006).

Kančí spermie mají vysokou koncentraci nenasycených mastných kyselin v plazmatické membráně a nedostatečný enzymatický antioxidační systém. To je příčinou jejich náchylnosti k nadměrnému působení reaktivních forem kyslíku (Cerolini a kol., 2000; Strzezek a kol., 2005). Oxidace vysokého obsahu nenasycených mastných kyselin vede ke vzniku poškození, která nepříznivě ovlivňují motilitu, metabolismus, ultrastrukturu a fertilitu spermii. Oxidace lipidů hraje také důležitou roli v procesu stárnutí spermii, který omezuje jejich životaschopnost *in vitro* během uchovávání spermatu pro účely inseminace (Alvarez, Storey, 1982).

Semenná plazma

Semenná plazma představuje přirozené prostředí spermii. Umožňuje jejich výživu a transport v pohlavních orgánech samice. Hlavní složku semenné plazmy tvoří 97-99 % vody, dále obsahuje minerální prvky, bílkoviny, cukry, kyselinu citronovou a askorbovou, enzymy, prostaglandiny, estrogeny a androgeny (Kudláč, 2003; Říha a kol., 2003).

1.1.2 Fyzikální vlastnosti kančího spermatu

Objem spermatu

Objem ejakulátu je fyzikální parametr spermatu, který se hodnotí bezprostředně po jeho odběru. U kanců se objem ejakulátu liší v závislosti na věku, jednotlivci, hmotnosti, krmení, frekvenci ejakulace, zdravotním stavu, způsobu odběru, působení stresu (Frunza a kol., 2008). V průměru se hodnoty objemu u mladých kanců pohybují mezi 120 - 200 ml a u starších kanců mezi 200 - 350 ml (Gramčík a kol., 1976).

Koncentrace spermií

Koncentrace spermií v ejakulátu je důležitý indikátor kvality spermatu. Vyjadřuje se počtem spermií zjištěných na 1 mm^3 ejakulátu. Průměrná hodnota koncentrace spermií se u kanců pohybuje v rozmezí 250 – 400 tisíc spermií/ mm^3 . Koncentraci spermií v ejakulátu lze zjistit metodami fotometrickými, hemocytometrickými nebo počítačem částic. Zjištění přesné koncentrace spermií je důležité nejen pro zjištění kvality spermatu, ale také k určení stupně ředění spermatu pro jeho další využití (Čeřovský, 2001).

Motilita spermií

Motilita spermií je ovlivňována souborem endogenních a exogenních faktorů. Z endogenních faktorů sem jsou uváděny věk donora, doba pobytu spermií v nadvarleti, doba mezi a po ejakulaci, zrání spermií, energetická zásoba ATP, membránový transport, pohyb bičíku, vazebné proteiny, aglutinační faktory, protilátky, detergenty, membránová integrita a úroveň aktivity receptorů. Mezi exogenní faktory patří hydrodynamika, viskozita, osmolarita, pH prostředí, teplota, iontové složení. U ejakulátů určených k inseminaci nebo konzervaci se požaduje minimální aktivita 70%. Průměrná rychlost spermií je okolo $43 \mu\text{m/s}$ (Věžník a kol., 2004).

Barva spermatu

Zbarvení spermatu je důležitý fyzikální parametr ejakulátu. Normální barva kančího spermatu je bílá s namodralými stíny. Pokud je odběr ejakulátu opakován vícekrát denně, pak je spermatická tekutina více čirá v důsledku klesající koncentrace spermií (Frunza a kol., 2008).

Barva spermatu může mít různé odstíny, které jsou ovlivněné různými faktory:

- Žluté zbarvení spermatu může být způsobeno vysokým obsahem karotenu v krmivu. Další příčinou mohou být hnisavé procesy na různé úrovni genitálního traktu nebo přítomnost moči.
- Růžové zbarvení ejakulátu indikuje přítomnost červených krvinek. Příčinou může být krvácení do penisu, předkožky, močové trubice, prostaty. Krvácení se také objevuje při ruptuře krevních cév močové trubice během odběru spermatu.
- Hnědá barva značí přítomnost zničených červených krvinek nebo infekce prostaty.
- Zbarvení do zeleno-modra je pozorováno v případě oligospermie, což je snížené množství spermií v ejakulátu nebo při léčbě methylenovou modří (Frunza a kol., 2008).

Pach spermatu

Čistý ejakulát má nevýrazný pach, který je přirovnáván k vaječnému bílku (Bažant, 1988). Ejakulát, který byl kontaminován tekutinou z předkožkového vaku, má velmi výrazný pach (Almond a kol., 1994).

pH spermatu

Důležitým ukazatelem kvality spermatu je pH. Hodnota pH čerstvě ejakulovaného kančího spermatu je asi $7,4 \pm 0,2$. To je hodnota podobná jako u jiných tělních tekutin. Pokud je tato hodnota snížena, sníží se také metabolismus a pohyblivost spermií (Gadea, 2003).

Hodnota pH vyšší než 8 po odběru značí nízkou kvalitu spermií nebo také infekci genitálního traktu či přídatných pohlavních žláz (Frunza a kol., 2008).

Osmotický tlak

Kančí spermie mají osmotický tlak 290 – 300 mOsm/kg. Mohou ale tolerovat poměrně širokou škálu osmotických tlaků, a to 240 – 380 mOsm/ kg (Gadea, 2003). Fraser a kol. (2001) uvádí, že ani pohyblivost ani životaschopnost spermií není ovlivněna osmotickým tlakem v rozmezí 250 – 290 mOsm/kg. Při tlacích pod 200 mOsm/kg je výrazně snížena motilita (Fraser a kol., 2001).

1.1.3 Chemické vlastnosti kančího spermatu

Znalost chemického složení semenné plazmy je důležitá při vytváření ředidel pro sperma. Ředidla udržují a prodlužují životaschopnost spermií po celou dobu konzervace ejakulátu. Kančí sperma obsahuje 8 % organických látek a 2 % minerálních látek. Celkem 10 % sušiny a 90 % vody (Frunza a kol., 2008).

Sacharidy jsou obsaženy jak ve spermiích, tak v semenné plazmě. Mají důležitou úlohu v energetickém metabolismu. Podle Holta a Harrisona (2002) obsahuje kančí sperma 77 mg sacharidů ve 100 ml. Turba a kol. (2007) uvádí, že kančí sperma obsahuje 6 až 18 mg % v 1 ml sorbitolu a 20 až 40 mg % v 1 ml fruktózy.

Kančí sperma je bohaté na inositol, a to průměrně 600 až 725 mg %. Úkolem inositolu je zajistit osmotický tlak v kančí semenné plazmě (Frunza a kol., 2008).

V kančím spermatu se ve vysokých hladinách nachází kyselina sialová (Ardelean, 2002). Kyselina citronová v kančím spermatu pochází ze semenných váčků, a je zde obsažena v množství 130 mg % (Cerolini a kol., 2001).

Argawal a kol. (2003) ve svém výzkumu uvádí, že obsah lipoproteinů v kančím spermatu je $404,02 \pm 27,82$ mg % a obsah glycerol fosforylcholinu se pohybuje v rozmezí 110 až 204 mg %.

Certurion a kol. (2003) stanovili průměrný obsah bílkovin v kančím spermatu na 1840 ± 74 mg%.

Kvalitativně i kvantitativně identifikovali obsah aminokyselin v kančím spermatu Cheminade a kol. (2002). V nejvyšší míře prokázali přítomnost kyseliny glutamové, a to v množství $64,96 \pm 2,73$ mg%. Dále byla prokázána přítomnost metioninu $11,9$ mg%, glycinu $4,71 \pm 0,7$ mg%, kyseliny asparagové $2,91 \pm 0,46$ mg%.

U kanců je množství proteinů ve spermatu nižší než v krevní plazmě. Obsah proteinů ve spermatu se pohybuje mezi 326 a 400 mg% (Frunza a kol., 2008).

Spermie jsou bohaté na androgenní a estrogenní hormony. Obsahují mnoho enzymů, např. katalázu, fosfatázu, mucinázu, hyaluronidázu, trypsin, amylázu, lipázu a cholinesterázu (Watson, 1990).

Semenná plazma kanců obsahuje všechny známé vitamíny (A, C, D, B komplex atd.). Vitamin C je nezbytný pro životaschopnost spermií. Jeho nízká koncentrace způsobuje nízkou plodnost (Agarwal a kol., 2003; Estienne a Harper, 2004).

Kančí sperma obsahuje vysoké množství anorganických látek. Minerální soli ve spermatu zajišťují potřebný osmotický tlak pro udržení integrity membrány. Ionty také přispívají k aktivaci enzymů (Kommisrud a kol., 2002). Strzežek a kol. (1995) uvádí průměrný obsah sodíku 660 mg%, chloridu 330 mg%, draslíku 260 mg%, hořčíku 11 mg%, vápníku 2-6 mg% a anorganického fosforu 2 mg%.

1.2 Mikroorganismy ve vzorcích spermatu chovných kanců

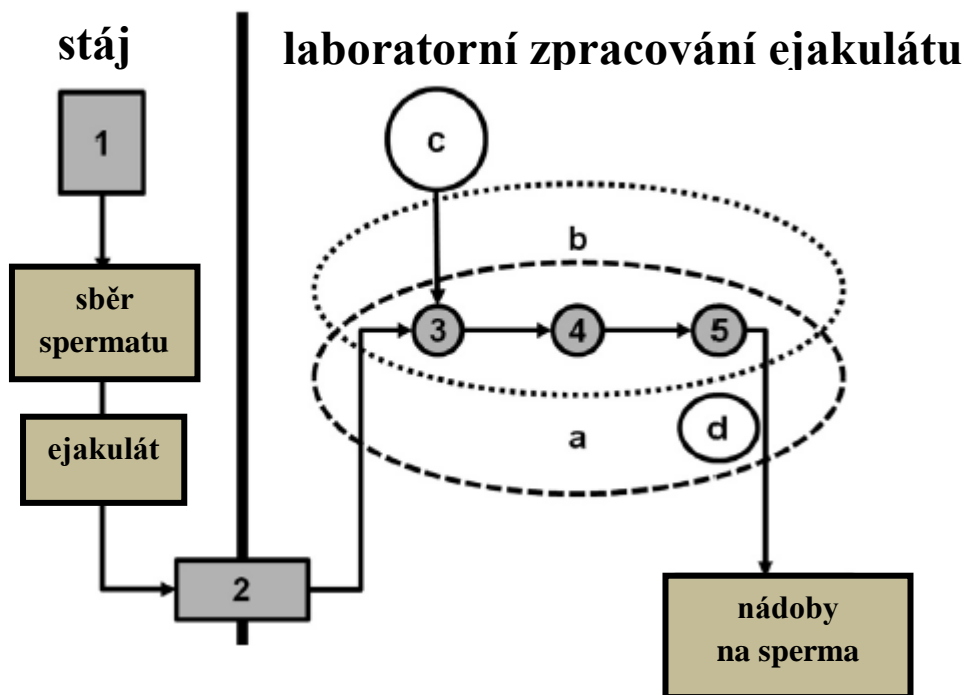
Sperma je ideální prostředí pro růst mnoha mikroorganismů, včetně bakterií a plísní. Testikulární tkáň a příslušné žlázy kanců jsou ve většině případů bez bakterií. K bakteriální kontaminaci ejakulátu dochází až během procesu sběru spermatu. Proces odběru kančího spermatu není sterilním postupem. V důsledku toho je odebrané kančí sperma běžně kontaminováno. Manipulace s kančím ejakulátem v průběhu zpracování v laboratoři může také vést k zavedení kontaminace do vzorku. Bakteriální kontaminace je důležitým parametrem, který je třeba brát v úvahu při kontrole kvality spermatu při jeho použití k inseminaci (Althouse a Lu, 2005; Althouse a kol., 2008; Martín a kol., 2010).

1.2.1 Zdroje kontaminace

Bylo zjištěno, že ke kontaminaci kančího spermatu může dojít během procesu odběru i během zpracování ejakulátu. Zdroji kontaminace mohou být fekálie, kůže, sekrety respiračního systému, ale také voda z kohoutku, krmivo, stelivo, vzduch, ventilační systémy apod., odtud se pak kontaminanty dostanou do těla kanců. Dalšími zdroji kontaminace mohou být např. peristaltické hadičky, nádoby na ředidla, teploměry, pipety. To jsou předměty, se kterými přijde sperma do přímého kontaktu (Althouse a kol., 2000).

Pokud není bakteriální kontaminace kančího spermatu kontrolována, dochází ke snížení reprodukčních schopností prasnic. Je proto důležité dodržovat hygienické zásady, mezi které patří: správná hygiena předkožky kance, správná fixace penisu při odběru spermatu, vyražení prvního proudu ejakulátu, používání jednorázových rukavic personálem (Althouse a kol., 2000; Bortolozzo, Went, 2005).

Forma fixace penisu kance, délka trvání odběru spermatu, hygiena předkožky kance a používání rukavic jsou faktory, které jsou při sběru spermatu závislé na týmu personálu, který jej provádí. Zásadní význam na snížení kontaminace ejakulátu má cílené zaškolení personálu a jeho znalost specifických postupů (Althouse a Lu, 2005; Bortolozzo a Went, 2005; Althouse a kol., 2008).



Obrázek 1: Pracovní postup a vybrané hygienické kritické kontrolní body při zpracování kančího spermatu. (1) odběrová místnost; (2) přeprava ejakulátu; (3) ředidla; (4) vnitřní strana víčka ředící nádoby; (5) barviva; (a) manuální operační vlivy (telefon, klávesnice), (b) laboratorní povrchy; (c) čističky odpadních vod; (d) dřezy, odpady (Schulze a kol., 2015)

1.2.2 Nejčastěji se vyskytující mikroorganismy v kančím spermatu

Althouse a kol. (2008) ve své studii uvádí, že 71 % kontaminujících bakterií je tvořeno těmito zástupci: *Alcaligenes xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia (E.) coli*, *Serratia marcescens* a *Stenotrophomonas maltophilia*. Zbylé identifikované bakterie zahrnují *Acinetobacter lwoffii*, *Aeromonas schubertii*, *Enterobacter agglomerans*, *Flavobacterium spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas spp.* a *Ralstonia pickettii*.

Bakteriální kontaminaci u 63 % vzorků nezpracovaného kančího spermatu prokázali Bresciani a kol. (2014). Identifikovali různé bakteriální druhy, konkrétně *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* a *Pseudomonas aeruginosa*. *E. coli* byla nejčastější kontaminující bakterií (byla prokázána u 53 % vzorků). *Pseudomonas aeruginosa* byla izolována pouze z jednoho vzorku.

Martín a kol. (2010) vyšetřili celkem 115 vzorků kančího spermatu. Uvádí, že 29 vzorků nevykazovalo žádnou bakteriální kontaminaci. 12 vzorků bylo pozitivních na 1 druh bakterie, 45 vzorků na 2 druhy bakterií, 24 vzorků na 3 druhy a 5 vzorků na 4 druhy. *E. coli* byla uvedena jako nejčastější kontaminanta kančího spermatu. Celkem byla prokázána u 79 % vzorků. Dalšími častými kontaminanty byly *Proteus* a *Serratia spp.* (36 %), *Enterobacter spp.* (29 %), *Klebsiella spp.* (14 %), *Staphylococcus spp.* (12 %), *Streptococcus spp.* (9 %), *Pseudomonas spp.* (8 %) a anaerobní bakterie (1 %).

Gączarzewicz a kol. (2016) testovali 79 vzorků kančího ejakulátu. Uvádí, že 78 ze 79 vzorků bylo pozitivních na přítomnost aerobních bakterií, a to v koncentracích mezi 80 až 370 CFU/ml. Izolovali *Enterobacter spp.*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*; *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* Jako nejčastější kontaminanty uvádí bakterie rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus* a neidentifikované bakterie rodu *Pseudomonas*. Dále uvádí, že neprokázali žádné striktně anaerobní bakterie ani plísňe.

1.2.3 Charakteristika nejčastěji se vyskytujících mikroorganismů

Čeled' *Enterobacteriaceae*

Čeled' také nazývaná enterobakterie zahrnuje gram-negativní, nesporulující, fakultativně anaerobní tyčinky, někdy kokobacily, většinou pohyblivé. Tvoří katalázu, netvoří oxidázu. Jsou kultivačně nenáročné, mají respirační a fermentační metabolismus. Při zpracování cukrů tvoří kyseliny, často i plyn (Bednář a kol, 1999; Tadesse a Alem, 2006).

Rod *Escherichia*

Nejvýznamnějším zástupcem rodu *Escherichia* je druh *Escherichia coli*. *E. coli* je fakultativně anaerobní, štěpí glukózu a laktózu za tvorby plynu, tvoří indol a neštěpí močovinu. Pohybuje se prostřednictvím bičíků, které se nacházejí po celém povrchu bakteriální buňky. Bakterie na svém povrchu nese dva typy fimbrií. První typ se skládá z kyselého hydrofobního proteinu fimbrinu, který umožňuje bakterii přichytit se na epitel hostitele a následně jej kolonizovat. Je vysoce antigenní, jelikož obsahuje F antigeny. Druhým typem fimbrií jsou sex pili, které jsou důležité při konjugaci (Votava a kol., 2010).

Nejvýznamnějším oportunně patogenním druhem je *E. coli*. Přirozeně se vyskytuje v tlustém střevě a ve spodní části tenkého střeva. Obvykle se častěji vyskytuje u masožravců a všežravců než u býložravců. Tato bakterie je vylučována stolicí. V trusu, prachu a vodě může přežít po dobu několika týdnů až měsíců. Ve střevě je patogenní, jen pokud je vybavena faktory virulence, mimo střevo je patogenní téměř vždy. *E. coli* vyvolává zejména infekce močových cest, infekce ran, septická onemocnění, průjmy (Bednář a kol., 1999; Quinn a kol., 1994; Votava a kol., 2010).

Rod *Enterobacter*

Do tohoto rodu patří opouzdřené gram-negativní tyčinky. Vyskytuje se v půdě, vodě, jako komenzál v zažívacím traktu lidí i zvířat. Může vyvolat infekce močových cest. Mezi významné druhy patří *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter sakazakii* (Bednář a kol., 1999; Tadesse a Alem, 2006).

Rod *Klebsiella*

Rod *Klebsiella* je blízký rodu *Enterobacter*, na rozdíl od něj je ale lépe adaptován na život mimo střevo. Charakteristickým znakem je tvorba pouzder, díky kterým jsou kolonie výrazně mukózní. Významná je absence pohybu a ureázová aktivita. Jako střevní komenzály jsou klebsiely méně běžné než enterobaktery. Může způsobit infekce močových cest, mastitidy, pneumonie a hnisavé infekce. Mezi významné zástupce patří *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca* (Bednář a kol., 1999; Markey a kol., 2013; Votava a kol., 2007).

Rod *Proteus*

Vyskytuje se ve střevním traktu lidí i zvířat, v půdě, vodě i kanalizaci. Jsou to pohyblivé, neopouzdřené, pleomorfní tyčinky. Způsobují infekce močových cest, otitidy a průjmy. Významnými druhy jsou *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris*. Jejich charakteristickou vlastností je plazivý růst na tuhých médiích. Z biochemických vlastností je nápadná tvorba ureázy (Bednář a kol., 1999; Markey a kol., 2013; Tadesse a Alem, 2006).

Rod *Pseudomonas*

Do rodu *Pseudomonas* patří středně velké gram-negativní tyčinky. Pohybují se díky přítomnosti jednoho nebo více polárních bičíků. Jsou striktně aerobní, oxidáza i kataláza pozitivní. Rostou při teplotách od 4 do 42 °C a některé kmeny jsou schopné tvořit pigmenty. Běžně se vyskytují v odpadních vodách, půdě i v trávicím traktu savců. Nejvýznamnějším zástupcem je *Pseudomonas aeruginosa* (Bednář a kol., 1999; Quinn a kol., 1994).

Pseudomonas aeruginosa vytváří kovově lesklé kolonie, které na krevním agaru tvoří zóny úplné hemolýzy. Vytváří modrozelený pigment pyocyanin. Charakteristická je také jasmínová vůně. Vyskytuje se v půdě a vodě, může být ale nalezena i na kůži, sliznicích a ve výkalech zvířat (Bednář a kol., 1999; Tadesse a Alem, 2006).

Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou gram-pozitivní koky o průměru asi 1 µm, uspořádané jednotlivě, v párech, tetradách, v krátkých řetězcích o nejvýše čtyřech buňkách a především v nepravidelných shlucích tvaru hroznů. Jsou nepohyblivé, netvoří spory. Až na výjimky jsou fakultativně anaerobní, kataláza – pozitivní, oxidáza – negativní (Votava a kol., 2007). Stafylokoky mají většinou respirační i fermentační metabolismus. Při zkvašování cukrů tvoří kyseliny, ne však plyn. Jsou do značné míry rezistentní k nepříznivým vlivům zevního prostředí, jako je vyšší teplota, vyšší koncentrace NaCl a vysychání. Díky těmto vlastnostem mohou být součástí normální mikroflóry kůže a sliznic. Některé druhy produkují ve vodě nerozpustné pigmenty karotenového typu, které zbarvují kolonie krémově, žlutě až oranžově. Nepigmentující druhy rostou v bílých nebo šedých koloniích (Bednář a kol., 1999).

Nejvíce se stafylokoky nacházejí u zvířat, některé druhy jsou patogenní. Jsou považovány za podmíněně patogenní, vyvolávají akutní a hnisavé infekce. Dva hlavní patogenní stafylokoky, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* a *Staphylococcus pseudintermedius*, jsou koaguláza – pozitivní. Test na koagulázu obvykle dobře koreluje s patogenitou. Koaguláza – negativní stafylokoky jsou komenzálové běžně se vyskytující v životním prostředí. Jsou považovány za hlavní složku normální mikroflóry zvířat a lidí. Občas mohou způsobit oportunní infekce. Rod *Staphylococcus* je v přírodě široce rozšířený

a běžně se vyskytuje po celém světě u savců i ptáků. Kolonizují nosní dutinu, nosohltan, kůži a sliznice. Přechnodně se mohou nacházet i ve střevním traktu (Markey a kol., 2013).

Rod *Streptococcus*

Streptokoky jsou gram – pozitivní, kataláza – negativní, oxidáza - negativní koky uspořádané do dvojic a řetízků. Nejsou pohyblivé. Na krevním agaru rostou v drobných koloniích většinou obklopených zónou alfa nebo beta hemolýzy. Až na výjimky nerostou při 10°C ani 45°C, v přítomnosti 6,5 % NaCl nebo 40 % žlučových solí. Nerostou ani při pH vyšším než 9. Většina druhů je fakultativně anaerobní, růst některých je podporován CO₂. Konečným produktem při fermentaci cukrů je kyselina mléčná. Některé druhy jsou primárně patogenní (*Streptococcus pyogenes*), velkou skupinu tvoří druhy podmíněně patogenní (Bednář a kol., 1999; Votava a kol., 2007).

Streptokoky jsou komenzálové sliznic, jsou součástí normální mikroflóry dutiny ústní, horních cest dýchacích, mohou být přítomny v zažívacím traktu. Většina streptokoků se vyskytuje u zvířat jako komenzálové sliznic horních cest dýchacích a dolního urogenitálního traktu. Jsou náchylné k vyschnutí (Bednář a kol., 1999; Markey a kol., 2013).

1.3 Vliv mikroorganismů na kvalitu kančího spermatu

Produkce spermatu o vysoké kvalitě je důležitá zejména proto, že sperma jednoho kance může být použito pro inseminaci více prasnic (Rozeboom, 2000).

Bakteriální kontaminace je důležitý ukazatel kvality kančího spermatu používaného k inseminaci. Kontaminace kančího spermatu obvykle zhoršuje jeho kvalitu. Přítomnost bakterií v kančím spermatu je dáována do souvislosti s aglutinací spermií, sníženou životností spermií. Dále může mít vysoký počet bakterií vliv na integritu akrozomu, osmotický tlak nebo pH spermatu. Bakteriální kmeny detekované v kančím spermatu patří převážně do čeledi *Enterobacteriaceae*. Většina z těchto kmenů není považována za primární patogeny kanců. Ke kontaminaci může dojít v důsledku infekce močových cest nebo během odběru spermatu (Althouse, 2000; Kuster, Althouse, 2016; Úbeda a kol., 2013).

Kontaminace kančího spermatu může způsobit neplodnost z důvodu vzniku endometritidy u samice, embryonální či fetální smrt a další onemocnění a infekce (Maes, 2008; Martinet, 2010).

Bakterie působí svým spermicidním účinkem přímo na spermie. Hlavní spermatotoxické účinky bakterií na spermie souvisí s přímým rozrušením spermií. Dále jsou spermie poškozovány lipopolysacharidem a cytolysinem bakterií, působením leukocytů a protilátek (Kuster, Althouse, 2016).

Dosud je nejvíce prostudována interakce *E. coli* na spermie. *E. coli* přilne k povrchu prostřednictvím manózu vázajících adhezinů. Tato vazba vede k ultrastrukturálnímu poškození plazmatické membrány spermií. Spermicidní účinek se odvíjí od koncentrace bakterií ve vzorku. Pro *E. coli* byl stanoven poměr bakterie ke spermiím 1:1 jako prahová hodnota pro indukci aglutinace a snížení pohyblivosti spermií (Althouse, Lu, 2005; Althouse Pierdon, Lu, 2008).

Martín a kol. (2010) ve své studii uvádí, že ze 115 vzorků jich 72 (63 %) vykazovalo určitý stupeň aglutinace. *E. coli* byla přítomna u 63 vzorků (tj. 55 %). *E. coli* izolovaná ze spermatu je schopná vyvolat velmi silnou aglutinaci spermií. Aglutinace byla pozorována makroskopicky jako malé bílé shluky, které lze snadno pozorovat pouhým okem na podložním sklíčku. Kromě aglutinace spermií má přítomnost *E. coli* v kančím spermatu vliv na velikost vrhu. Nižší počet narozených mláďat se objevuje při koncentraci *E. coli*

nad $3,5 \times 10^3$ CFU/ml. Pokud sperma obsahuje více než $3,5 \times 10^3$ CFU/ml *E. coli* nemělo by být pro umělou inseminaci použito.

Yaníz a kol. (2010) uvádí, že u vzorků skladovaných při 15°C s přítomností *E. coli* došlo k drastickému snížení pohyblivosti, rychlosti a životaschopnosti spermií. Tyto změny byly méně intenzivní u vzorků, kde byly přítomny *Staphylococcus aureus* nebo *Staphylococcus epidermidis*.



Obrázek 2: Aglutinace spermií způsobená bakteriální kontaminací (Kuster, Althouse, 2016)

Jako hlavní problém bakteriální kontaminace kančího spermatu uvádí Úbeda a kol. (2013) snížení pohyblivosti spermií. Pohyblivost byla výrazně snížena u vzorků spermatu, které obsahovaly tyto mikroorganismy: *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*.

Morganella morganii je dávána do souvislosti se snížením koncentrace spermií v ejakulátu a s morfologickými abnormalitami akrozomu. *Proteus mirabilis* způsobuje abnormality ve tvaru spermií (Úbeda a kol., 2013).

Přítomnost *Pseudomonas aeruginosa* v kančím spermatu je potenciální zdroj šíření infekčních chorob. Negativně ovlivňuje životnost a fertilizační schopnosti spermií.

Pseudomonas aeruginosa vyvolává škodlivé účinky na kvalitu kančích spermií i během skladování v kapalné formě při 15-17°C (Sepúlveda a kol., 2014).



Obrázek 3: Kančí spermie a bakterie *Pseudomonas sp.* (Kuster a Althouse, 2016)

1.4 Inhibice mikroorganismů v kančím spermatu

1.4.1 Ředění a konzervace kančího spermatu

Ředidla jsou vodné roztoky, které se používají ke zvýšení objemu ejakulátu a k získání většího množství inseminační dávky. Dalším důvodem používání ředidel je zajištění optimálního prostředí pro spermie, ve kterém zůstanou živé několik dní (Gadea, 2003).

Spermie se nacházejí v semenné plazmě, která jim dodává potřebné živiny pro vysoké metabolické nároky při transportu spermií prostředím pohlavního ústrojí samice. V ejakulátu může být tato vysoká metabolická aktivita zachována jen po omezenou dobu. Aby mohli být spermie uchovány delší dobu, musí být jejich metabolická aktivita snížena uchováváním při snížené teplotě. V praxi je doporučena teplota 15 – 20°C. Nižší teplota skladování prodlužuje jejich životaschopnost (Gadea, 2003; Paulenz a kol., 2000).

Stupeň ředění spermatu, resp. konečný objem naředěného spermatu, určuje zvolený počet aktivních spermií v jedné inseminační dávce a celkový počet aktivních spermií ve spermatu. K inseminaci se používají inseminační dávky s obsahem 1,5 -3 miliardy spermií, u zmrazeného spermatu 2,5 – 5 miliard o objemu 80 – 100 ml (Říha a kol., 2003).

Principem konzervace spermatu je uvedení spermií do stavu anabiózy (polospánku), kdy je metabolismus spermií nejnižší. Tohoto stavu lze dosáhnout snížením teploty na 16 až 18°C a složením ředidel. V průběhu konzervace nesmí dojít k poškození povrchových membrán akrozomu, aby nedošlo k poškození jejich fertilizační schopnosti. Ředidla používána při konzervaci kančího spermatu proto obsahují ochranné a výživné látky. Jedná se především o glukózu, citronan sodný, uhličitán sodný, chelaton a aminokyseliny (Kopřiva a kol., 1996).

Spermie produkují energii potřebnou pro udržení metabolismu a pro pohyb bičíku prostřednictvím glykolytické dráhy. Tyto procesy probíhající v mitochondriích se nachází v prostřední části spermie. Zdrojem energie nejčastěji používaným v ředidlech ejakulátu je glukóza. Byly testovány i jiné cukry např. galaktóza, fruktóza, ribóza, trehalóza, ale byly u nich pozorovány horší výsledky (Gadea, 2003).

Pro kontrolu pH ředidel se využívají pufrční činidla. Hodnota pH kančího ejakulátu se pohybuje kolem $7,4 \pm 0,2$. Pokud je tato hodnota snížena, sníží se také metabolismus a pohyblivost spermií. Mezi nejjednodušší používané pufrы patří uhličitán sodný nebo citrát

sodný, které mají omezenou pufrací kapacitu. Složitější pufrů např. TES, Hepes, MOPS, Tris mohou kontrolovat pH v širším rozmezí. Pufrů MOPS a Hepes nejsou závislé na teplotě (Gadea, 2003).

EDTA se přidává do ředidel kančího spermatu pro své chelatační vlastnosti. Když jsou vápenaté ionty zachyceny, je inhibována iniciace kapacitace spermií (Watson, 1995).

K regulaci osmotického tlaku v kančím ejakulátu se používají soli anorganických iontů, jako jsou sodík a chlorid draselný (Gadea, 2003).

Pro běžné účely produkce mohou být ředidla rozdělena do dvou hlavních skupin, a to na ředidla ke krátkodobému a dlouhodobému uchování spermatu. Krátkodobá ředidla prodlužují životaschopnost spermií až na dobu 3 dnů a jsou široce využívána po celém světě pro rutinní práci. Při použití dlouhodobých ředidel lze prodloužit životaschopnost spermií až na 5 – 7 dní. Jsou používána, pokud je sperma skladováno několik dní nebo pokud je přepravováno na dlouhou vzdálenost. Dlouhodobá ředidla obsahují BSA, který má pozitivní vliv na přežívání spermií. Cystein je používán jako stabilizátor membrán inhibující kapacitaci (Almond a kol., 1994; Gadea, 2003; Johnson a kol., 2000).

V současné době je jedním z nejpoužívanějších ředidel BTS (Beltsville Thawing Solution) vyvinuté Purselem a Johnsonem v roce 1975 pro rozmrazování zmrazeného kančího spermatu. V roce 1988 bylo Johnsonem a kol. upraveno pro skladování spermatu. Toto krátkodobé ředidlo je složeno z 205 mM glukózy; 20,39 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 15,01 mM NaHCO₃; 3,35 mM EDTA (Johnson a kol., 1988). BTS obsahuje nízkou koncentraci draslíku. Udržuje intracelulární koncentraci tohoto iontu na fyziologické hladině během skladování (Johnson a kol., 2000).

Tabulka 1: Složení krátkodobých a dlouhodobých ředidel používaných pro kančí sperma (Vyt, 2007).

| | Krátkodobá ředidla | | Dlouhodobá ředidla | | |
|--------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|
| | BTS ¹ | Kiev ² | Androhep ³ | Modifikovaná Modena ⁴ | Zorlesco ⁵ |
| Glukóza (g/l) | 37,00 | 60,00 | 26,00 | 25,00 | 11,50 |
| Citrát sodný (g/l) | 6,00 | 3,70 | 8,00 | 6,90 | 11,70 |
| NaHCO ₃ (g/l) | 1,25 | 1,20 | 1,20 | 1,00 | 1,25 |
| EDTA (g/l) | 0,75 | 3,70 | 2,40 | 2,25 | 2,30 |
| HEPES (g/l) | | | 9,00 | | |
| BSA (g/l) | | | 2,50 | 3,00 | 5,00 |
| Kyselina citrónová (g/l) | | | | 2,00 | 4,10 |
| Tris pufr (g/l) | | | | 5,65 | 6,50 |
| Cystein (g/l) | | | | 0,05 | 0,10 |

Legenda: ¹ Pursel a Johnosn, 1975

² Waberski, 1994

³ Weitze, 1990

⁴ Johnson a kol., 1988

⁵ Gottardi, a kol., 1980

1.4.2 Antibiotika v ředidlech kančího spermatu

Komponenty ředidel, tedy především glukóza a dále teplota, při které je sperma skladováno (15 – 17°C) podporují růst většiny gram-negativních bakterií. Bakteriální kontaminace kančího spermatu snižuje jeho kvalitu, což následně vede i ke snížení doby, po kterou může být sperma uchovááno (Gadea, 2003).

Přidání antibiotik ve vhodné koncentraci zlepšuje přežití spermií a také zlepšuje výsledky plodnosti. Zpočátku byla nejčastěji používaná kombinace antibiotik penicilin a streptomycin v koncentraci 1 g/l. V návaznosti na to, jsou dnes úspěšně používány aminoglykosidy, včetně gentamycinu, neomycinu, kanamycinu v koncentraci asi 200 mg/l (Gadea, 2003).

Kombinace lincomycinu a spectinomycinu (300/600 µg), dále tylosin (100 µg) nebo gentamycin (500 µg) vykazují dobré výsledky proti mykoplazmatům, ale i dalším bakteriálním druhům (Lein, 1986; Shin, 1986).

Antibiotika mohou však být pro spermie toxická. Používání antibiotik v ředidlech kančího spermatu může mít nepříznivý vliv jak na kvalitu a životnost spermií, tak na životní prostředí. To omezuje výběr antibiotik, která mohou být použita do ředidel spermatu. Ve snaze snížit toxicitu na ejakulát je používána směs antibiotik. To může vést k rozvoji antibiotické rezistence, která může být přenesena i na ostatní bakterie v těle hostitele. U gentamycinu, což je běžně používané antibiotikum v komerčních ředidlech, byl prokázán nepříznivý vliv na pohyb a životaschopnost spermií. Dále je nezbytné, aby ředidla a sperma obsahující antibiotika, byly likvidovány schváleným způsobem pro inaktivaci antibiotik, předtím než se dostanou do životního prostředí (Aurich a Spergser, 2007; Morrell, 2016).

Tabulka 2: Rizika a výhody používání antibiotik v ředidlech spermatu (Morrell, 2016)

| | Rizika | Výhody |
|------------------------|---|--|
| Ředidla bez antibiotik | Bakterie soutěží se spermiemi o živiny, produkují toxické metabolity a lipopolysacharid. Mohou způsobit onemocnění u samic po umělé inseminaci. | Žádné toxické působení antibiotik na spermie ani riziko šíření antibiotické rezistence. |
| Ředidla s antibiotiky | Antibiotika mohou být toxická pro spermie. Bakterie mohou být na antibiotika již rezistentní, či naopak může dojít ke vzniku rezistence. Může dojít ke kontaminaci životního prostředí. | Zničení kontaminujících bakterií předtím než se začnou množit či než začnou soutěžit o živiny v ředidle. Bakterie nejsou převedeny na samice během umělé inseminace. |

Nejčastěji používaná antibiotika v ředidlech kančího spermatu jsou aminoglykosidy. Aminoglykosidy jsou hydrofilní cukry, které mají několik amino a hydroxy substituentů (Kotra a kol., 2000). Působí bakteriostaticky inhibicí syntézy proteinů a působením na mRNA při přepisu genetické informace (McPhee a kol., 2012).

Antibiotické spektrum aminoglykosidových antibiotik je poměrně široké. Zahrnuje gram-negativní (enterobakter, serracie, citrobakter, pseudomonády, klebsiely, salmonely, shigely) i gram-pozitivní bakterie (*Staphylococcus aureus*, včetně kmenů produkujících betalaktamázu a *Staphylococcus epidermidis*). Mezi méně citlivé až necitlivé bakterie patří streptokoky a enterokoky. Necitlivé jsou anaeroby (Martínková, 2007).

Působí baktericidně fází rychlého zabíjení (6 hodin). Po této fázi následuje bakteriostáza (postantibiotický efekt). Nevýhodou je možnost vzniku mnohočetné rezistence, jejíž příčinou bývají změny propustnosti buněčné mikrobiální stěny, modifikace nebo absence příslušného mikrobiálního receptoru nebo změna chemické struktury antibiotika adenylací, acetylací nebo fosforylací postranních skupin (Martínková, 2007).

Aminoglykosidy se nevstřebávají z gastrointestinálního traktu (GIT), po parenterálním podání se distribuují do extracelulárního prostoru, nepronikají intracelulárně. Mezi běžně dostupné a používané aminoglykosidy patří gentamycin, amikacin, kanamycin, neomycin a streptomycin. Neomycin je při parenterálním podání značně toxický, z GIT se nevstřebává. Podává se místně do tělních dutin, na kůži na drobná poranění, často v kombinaci s bacitracinem. Perorálně se podává k vyhubení aerobní střevní flóry. Gentamycin, tobramycin, amikacin, netilmicin se podávají intravenózně nebo intramuskulárně u závažných infekcí, jako jsou sepsa, pneumonie, infekce močových cest způsobené gram-negativními mikroby. Často se kombinují s betalaktamovými antibiotiky (Martínková, 2007).

1.4.3 Alternativa k antibiotikům v ředidlech kančího spermatu

Fyzikální odstranění bakterií z kančího ejakulátu

Navzdory potřebě hledat alternativa ke konvenčním antibiotikům, jsou výzkumy na toto téma stále ojedinělé. Během posledních dvou desetiletí je pozornost věnována koloidní centrifugaci kančího spermatu. Dříve byla pozornost věnována hlavně centrifugaci v hustotním gradientu (DGC), v poslední době se zaměřuje na jednovrstvou centrifugaci (SLC). Fyzikální odstranění bakterií ze vzorků spermatu např. koloidní centrifugací by mohla být efektivní alternativou k přidávání antibiotik do ředidel (Morrell, Wallgren, 2011).

Aplikace jednovrstvé centrifugace v konzervaci kančího spermatu jsou následující: zlepšit kvalitu spermií v umělé inseminaci, zvýšit dobu skladování vzorků spermatu, odebrat patogeny, a tím zlepšit biologickou bezpečnost dávky spermatu a snížit používání antibiotik (Morrel, Wallgren, 2011).

Koloidní centrifugace spermatu je relativně jednoduchá metoda, která je dostupná ve většině laboratoří na zpracování spermatu. Metoda jednovrstvé centrifugace je jednodušší a časově méně náročná než centrifugace v hustotním gradientu. Využívá pouze jednu vrstvu koloidu, čímž odpadá potřeba připravovat několik vrstev koloidu o různých hustotách. Připravený koloid je nalit do centrifugační zkumavky a ředěné sperma je vrstveno pečlivě navrch (obr. 4). Pro optimální selekci semene by neměla koncentrace spermií v ejakulátu přesáhnout přibližně 100 miliónů/ml, aby se předešlo přetížení koloidu. Zkumavka se odstředí při 300 x g 20 minut. Během centrifugace je semenná plazma umístěna v horní části, zatímco spermie jdou dolů skrze koloid. Peleta na dně zkumavky obsahuje pohyblivé a životaschopné spermie. Supernatant (obsahující ředidlo, semennou plazmu a mrtvé spermie) a většina koloidu je odsáta. Peleta spermatu je poté odebrána zpod zbytku koloidu sterilní pipetou a je přemístěna do čisté zkumavky s ředidlem spermatu (Morell, Wallgren, 2011; Morrell, Wallgren, 2014).

Koloidní centrifugace spermatu umožňuje odstranit významnou část kontaminujících bakterií. Mikroorganismy a jiné buňky se po centrifugaci nachází v semenné plazmě, která je umístěna v horní části zkumavky. Oproti tomu spermie, které chceme odebrat, tvoří peletu na dně zkumavky (Morrell, wallgreb, 2016; Morrell, Rodriguez – Martinez, 2016).



Obrázek 4: Jednovrstvá centrifugace ejakulátu s použitím Androcoll-E (Morrell, Wallgren, 2011)

Přírodní látky jako inhibitory mikroorganismů

Léčebné účinky přírodních látek jsou známy již po mnoho staletí. Jejich biologická aktivita zahrnuje antimikrobiální, antivirové, antimykotické a antiparazitární účinky. Systematické sledování antibakteriálních rostlinných extraktů představuje trvalou snahu najít nové sloučeniny s potenciálem nahradit antibiotika (Mazurová a kol., 2006).

Způsoby antimikrobiální aktivity sloučenin přírodního původu jsou předmětem výzkumu řady vědeckých pracovišť. Inhibiční vlastnosti těchto látek jsou ovlivňovány mnoha faktory. Stojanovic (2005) ve své studii informoval o nižší účinnosti přírodních sloučenin na gram-negativní bakterie. Kalembe a Kunická (2003) zjistili, že inhibiční účinky souvisejí také s hydrofilními a lipofilními vlastnostmi přírodních látek.

Terpenoidy jsou významné složky rostlinných silic a pryskyřic. Antimikrobiální účinnost terpenoidů podporuje jejich lipofilní charakter. Sloučeniny se vážou na lipidy vnější membrány, čímž negativně ovlivňují její integritu. S tím souvisí porucha funkce membránových proteinů, inhibice dýchání a narušení iontové rovnováhy, což následně vede ke smrti bakteriální buňky (Cowan, 1999, Dorman, Deans, 2000, Marino a kol., 2001, Trombeta a kol., 2005).

Mechanismus antimikrobiálního působení fenolových sloučenin, včetně kyseliny gallové, je založen na schopnosti narušit integritu bakteriální cytoplazmatické membrány a zasahovat do metabolismu bakterií (Mazurová a kol., 2015).

Kyselina gallová je přirozeně se vyskytující fenolická sloučenina s antioxidačními, antibakteriálními a antifungicidními účinky. Je vysoce rozpustná ve vodě a v polárních rozpouštědlech jako je metanol a etanol. Tato látka se nachází v habru, dubové kůře, duběnce, v zeleném a černém čaji, chmelu, granátovém jablku a v dalších rostlinách a plodech. Kyselina gallová se vyskytuje buď jako volná (nevázaná) molekula nebo může být vázána na molekuly tříslovin, ze kterých může být separována kyselinami nebo termální hydrolyzou (Mazurová a kol., 2015). Antimikrobiální aktivita fenolických produktů může zahrnovat různé způsoby účinku, a to destabilizaci a permeabilizaci cytoplazmatické membrány, inhibici enzymů oxidovanými produkty. Fenoly mohou inhibovat syntézu nukleových kyselin jak u gram-negativních, tak u gram-pozitivních bakterií (Cushnie, Lamb, 2005). Kyselina gallová mění bakteriální hydrofobicitu, je elektrofilní a významně tak ovlivňuje komponenty bakteriálního povrchu. Kyselina gallová ve styku s gram-negativními i gram-pozitivními bakteriemi propaguje poškození membrány, uvolnění intracelulárního obsahu a následnou smrt buněk. Tento účinek je závislý na bakteriálním druhu. Významné účinky byly zjištěny především u *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Účinné koncentrace kyseliny gallové jsou příliš vysoké a tedy nevhodné k samostatné aplikaci pro antimikrobiální terapii (Borges a kol., 2013).

Med je jedním z nejstarších tradičních léčiv používaných k léčbě mikrobiálních infekcí. Je také účinným antimikrobiálním činidlem používaným k léčbě popálenin a ran. Vysoký obsah cukru a fyzikálně – chemické vlastnosti medu jako je vysoká osmolarita, nízká aktivita vody a kyselost představují nevhodné podmínky pro růst bakterií (Faustino, Pinheiro, 2015). Antimikrobiální vlastnosti medu mohou být důležité proti bakteriím, u kterých se vyvinula bakteriální rezistence vůči antibiotikům (Armstrong, Otis, 1995).

Kwakman a kol. (2010) uvádí, že za antimikrobiální účinky medu je zodpovědný enzym defensin – 1, který je součástí imunitního systému medonosných včel. Přítomnost tohoto enzymu byla zjištěna také v medu. Defensin – 1 je peptid známý také jako royalisin. Tento enzym má silnou aktivitu pouze proti gram-pozitivním bakteriím včetně *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Paenibacillus larvae*, který je původcem ničivého onemocnění včelích larev (Kwakman a Zaat, 2012).

Schopnost medu vyrábět malé množství peroxidu vodíku, který zabíjí mnoho bakterií, hraje důležitou roli v antimikrobiální aktivitě medu (Kačániová a kol., 2011).

Chemické látky jako inhibitory mikroorganismů

Antimikrobiální efekt kovů, jako je rtuť, stříbro, měď, železo, olovo, zinek, bismut, zlato a hliník je nazýván oligodynamický efekt. Přesný mechanismus účinku není zcela znám. Předpokládá se, že kovové ionty denaturují enzymy cílové buňky vazbou na reaktivní skupiny a vedou k jejich srážení a inaktivaci. Bakterie obecně jsou tímto efektem ovlivněny, naopak viry nejsou k tomuto efektu citlivé. Tento nepoměr naznačuje, že toxické mechanismy mají vliv na metabolismus, protože viry nejsou metabolicky aktivní (Seiler, Berendonk, 2012).

Zinek je jedním z důležitých stopových prvků těla. Jeho nedostatečnost způsobuje neplodnost většiny zvířat. Dochází k poruchám vývoje varlat a spermatogeneze. Celkový obsah zinku ve spermatu savců je vysoký a je důležitý jak pro spermatogenezi, tak pro koncentraci spermií. Zinek přispívá ke stabilitě chromatinu spermií a opravě poškozené DNA (Dorostkar a kol., 2013).

Četné funkce semenné plazmy jsou výsledkem jejich schopnosti vázat zinečnaté ionty. Ty chrání chromatin spermií a regulují jejich motilitu. Dále tyto proteinové ligandy vyvíjejí imunomodulační, antibakteriální a antioxidační funkce v reprodukčním traktu (Mogielnicka-Brzozowska a kol., 2011).

Zinek je esenciální stopový prvek pro růst a enzymatickou aktivitu heterofilních bakterií. Avšak nadměrné zatížení zinkem vykazuje toxicitu a inhibici mikrobiálních procesů. Ve své studii Bong a kol. (2010) uvádí, že přidavek zinku nezpůsobil významné změny v počtu bakterií, ale snížil účinnost aminopeptidázy.

Kelly a kol. (2003) uvádí, že i když je zinek esenciální stopový prvek pro růst bakterií, při vysoké koncentraci zinku je většina bakterií inhibována. Jen velmi omezený počet rezistentních bakterií může přežít. Důvodem je, že těžké kovy mění konformaci struktury nukleových kyselin a proteinů, a v důsledku toho se tvoří komplexy s proteiny, které je činí neaktivními.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Vyšetřovaný materiál

Vyšetřovaným materiálem byly vzorky čerstvě odebraného kančího spermatu. Vyšetřovány byly vzorky nativní a ředěné krátkodobými i dlouhodobými ředidly s přísávkami různých inhibičních látek, jejichž účinnost byla testována. Vzorky kančího spermatu byly dodány Výzkumným ústavem živočišné výroby, v.v.i., oddělení chovu prasat, Kostelec nad Orlicí.

2.2 Testované látky

Testovanými látkami byly thiosíran sodný heptohydrát (Lachema Brno, č. šarže 40024/0291), Aurum koloidní zinek + vitamín C (Pharma Activ Czech s.r.o., bez šarže), kyselina gallová (Sigma-Aldrich, č. šarže 126284451107322), med. Dále byl testován účinek různých ředidel určených k ředění a uchování kančího spermatu. Přesné složení ředidel bylo známo pouze u některých z nich. Testovanými ředidly byly BTS bez antibiotik (Munitube, Germany, č. šarže 04032013), BTS s antibiotiky (Munitube, Germany, č. šarže 24020529201), Androhep (Munitube, Germany, č. šarže 23020527101), VIP 3 (Hema Malšice CZ, bez šarže), VIP 5 (Hema Malšice CZ, bez šarže), VIP 7 (Hema Malšice CZ, bez šarže), Vitasem LD (Magapor, Spain, bez šarže), BIO PIG (Magapor, Spain), M III (Munitube, Germany, č. šarže 25020533101), OPTIM (Magapor, Spain), SCP (IMV, France), koncentrát 1, koncentrát 2. Složení některých testovaných ředidel je uvedeno v tabulkách 3 a 4.

2.3 Přístroje a pomůcky

o Přístroje

Laminární box MCS 12 (JOUAN SA, Francie), třepačka Vortex-1 plus (BIOSAN, EU), zákaloměr DEN-1B (McFarland Densitometer, BIOSAN, Lotyšsko), světelný mikroskop Eclipse 80i (Nikon, Japonsko), digitální váhy 440-43 (KERN, Německo), plynový kahan, AEG SANTO chladnička a mraznička (Elektrolux, Švédsko), termostat skřínový TC 125S (Lovibond), biologický termostat BT 120MR (EKOM s.r.o., Polná), počítadlo kolonií Star-count STC 1000 (VWR International BVBA,

Švýcarsko), sterilizace skla (Sterimat HS202A, BMT Medical Technology s.r.o., ČR), sterilizace plastů (parní sterilizátor PS20A, Chirana, ČR) a sterilizace půd (horkovzdušný sterilizátor Sterilab, BMT Medical Technology s.r.o., ČR).

- o Chemikálie a pomůcky

Jednokanálové pipety (0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl; Sartorius – family Biohit, Německo), špičky (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl) a filtry (Sartorius – family Biohit, Německo), sterilní plastové Petriho misky 9 cm.

Skleněné lahve se šroubovacím závitem 500 ml (Fisher Scientific, spol. s.r.o., ČR), odměrné válce 25 ml, 500 ml (SIMAX – Kavalierglass, a.s., ČR), Erlenmayerova baňka 500 ml (Scientific, spol. s.r.o., ČR), skleněné zkumavky, stojany na zkumavky, silikonové a kovové zátky, bakteriologické kličky, skleněné L-hokejky.

Biochemické testy Mikrolatest (Erba Lachema, s.r.o.), fyziologický roztok, krevní agar, imerzní olej, peroxid vodíku 3%, parafínový olej, krystalová violet, karbolfuchsin, Lugolův roztok, destilovaná voda, etanol 70%.

2.4 Příprava kultivačních médií a roztoků

Krevní agar

17 g Blood Agar Base No. 2 (HiMedia Laboratories, č. šarže 0000154609) bylo rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Agarový základ byl sterilizován v parním sterilizátoru po dobu 15 minut při teplotě 121°C. Po vychladnutí přibližně na teplotu 45-50 °C bylo přidáno 20 ml defibrinované beraní krve. Připravená agarová půda byla nalita na plastové Petriho misky, které byly ihned zakryty víčky. Po vychladnutí byly skladovány v chladničce při teplotě 4°C. Maximální doba skladování krevního agaru je 3 týdny.

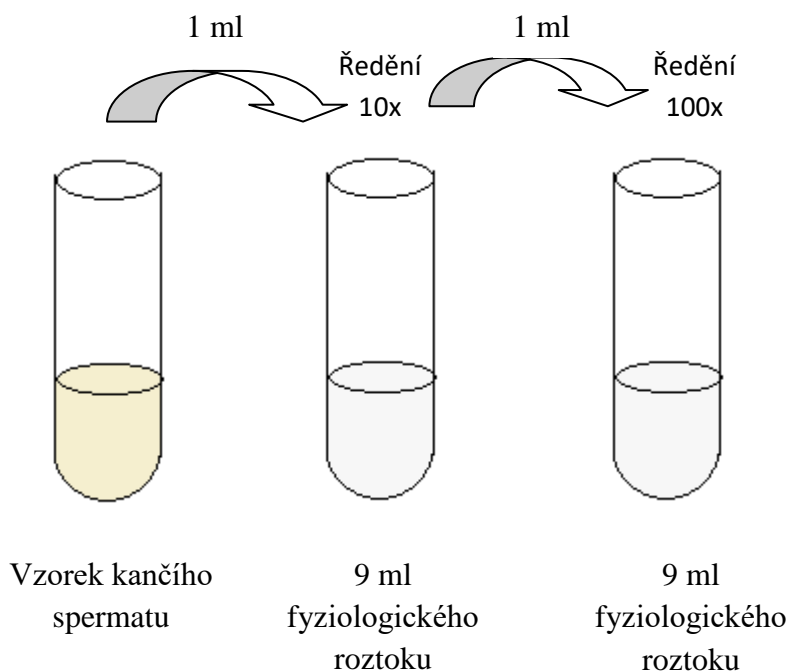
Fyziologický roztok

4,25 g NaCl (PENTA s.r.o., č. šarže 1801310113) bylo rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Připravený roztok byl sterilizován v parním sterilizátoru po dobu 15 minut při teplotě 121°C. Po vychladnutí byl fyziologický roztok skladován v chladničce.

2.5 Stanovení účinnosti inhibičních látek

Čerstvě odebrané vzorky kančího spermatu byly transportovány při cca 17°C. Poté byly ihned zpracovány. Následně byly umístěny do inkubátoru a uchovávány při teplotě 17°C po dobu 3 až 7 dnů, než byly vzorky opět kultivačně vyšetřeny.

Nejprve byla připravena ředící řada (viz obr. 5). A to tak, že do sterilních bakteriologických zkumavek umístěných ve stojánku bylo napipetováno 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Vzorky kančího spermatu v plastových zkumavkách byly řádně homogenizovány na vortexu. Následně byl ze vzorku spermatu odebrán 1 ml, který byl přenesen do první zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku. Zkumavka byla promíchána na vortexu. Tím vzniklo ředění vzorku 10x. Ze zkumavky ředěné 10x, byl poté odebrán opět 1 ml a přenesen do druhé zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku. Tím vzniklo ředění 100x. Původní vzorek kančího spermatu byl již naředěný při použití ředidla. Toto ředění bylo zahrnuto při výpočtu CFU.



Obrázek 5: Příprava ředící řady

Každý vzorek byl inokulován na krevní agar s 5 % defibrinované beraní krve. Inokulováno bylo pokaždé 100 µl vzorku, který byl následně rozetřen L-hokejkou po celé ploše krevního agaru na Petriho misce.

Po vsáknutí vzorku do krevního agaru byly Petriho misky vloženy v závěšené poloze do termostatu při 37°C. Vzorky byly inkubovány 48 hodin, jelikož 24 hodin inkubace bylo pro růst bakterií nedostačující.

Po 48 hodinách inkubace byl zjištěn počet kolonií na jednotlivých miskách pomocí počítačky kolonií. Následně byl stanoven celkový počet mikroorganismů v jednotkách CFU/ml, podle vzorce:

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1n_2) \cdot d}$$

$\sum C$... součet všech kolonií spočítaných na vybraných miskách

V objem inokula v ml (zpravidla 1 ml)

n_1 počet misek použitých pro výpočet z prvního použitého ředění

n_2 počet misek použitých pro výpočet z druhého použitého ředění

d faktor prvního pro výpočet použitého ředění

Ze vzorků kančího spermatu byly získány čisté kultury mikroorganismů, které byly identifikovány dle morfologie kolonií na kultivačních médiích, morfologie bakteriálních buněk po obarvení dle Grama a podle výsledků biochemických testů. Kmeny, které nebylo možné identifikovat biochemickými testy, byly dourčeny metodou MALDI – TOF MS na oddělení infekční diagnostiky Litomyšlské nemocnice.

Vzorky kančího spermatu byly testovány 3 nebo 7 dní podle typu použitého ředidla. Krátkodobá ředidla byla testována 3 dny, dlouhodobá 7 dní.

Tabulka 3: Složení testovaných ředidel Tekutý koncentrát ředidla, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Androhep, BTS, Vitasem LD

| Název ředidla | Tekutý koncentrát ředidla | VIP 3 | VIP 5 | VIP 7 | Androhep | BTS | Vitasem LD |
|----------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|----------|-----------|--------------------------------|
| Složení | | | | | | | |
| Glukóza | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | Složení neuveveno |
| Fruktóza | ✓ | | | | | | |
| Citronan sodný | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| EDTA | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| NaHCO ₃ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| KCl | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | | ✓ | |
| BSA | | | | | ✓ | | |
| Kyselina citronová | | ✓ | ✓ | ✓ | | | |
| Kyselina askorbová | ✓ | | | | | | |
| Acetylcystein | | ✓ | ✓ | ✓ | | | |
| Hepes pufr | ✓ | | | | ✓ | | |
| Kyselina hyaluronová | | ✓ | ✓ | | | | |
| Povidon 40 | | ✓ | ✓ | | | | |
| Inositol | | ✓ | ✓ | | | | |
| Laktóza monohydrát | | ✓ | ✓ | ✓ | | | |
| Antibiotika | | | | | | | |
| Gentamycin sulfát | Směs antibiotik dle 90/429/EEC | ✓ | ✓ | | | Neuveveno | Směs antibiotik dle 90/429/EEC |
| Gentamycin | | | | | ✓ | | |
| Amoxicilin | | ✓ | ✓ | | | | |
| Enrofloxacin | | | ✓ | ✓ | | | |
| Neomycin sulfát | | | | ✓ | | | |
| Polymyxin | | | | ✓ | | | |
| Apramycin | | | | ✓ | | | |

Pozn.: Povidon 40 – polyvinylpyrrolidon; absorbuje atmosférickou vlhkost až do 40 % své hmotnosti

Tabulka 4: Složení testovaných ředidel Tekutý koncentrát 1 a 2, BIO PIG, OPTIM, SCP, M III

| Název ředidla | Tekutý koncentrát 1 | Tekutý koncentrát 2 | BIO PIG | OPTIM | SCP | M III |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| Složení | | | | | | |
| Glukóza | ✓ | ✓ | Složení neuveveno | Složení neuveveno | Složení neuveveno | Složení neuveveno |
| Fruktóza | ✓ | ✓ | | | | |
| Citronan sodný | ✓ | ✓ | | | | |
| EDTA | ✓ | ✓ | | | | |
| NaHCO ₃ | ✓ | ✓ | | | | |
| KCl | ✓ | ✓ | | | | |
| Kyselina citronová | ✓ | ✓ | | | | |
| Acetylcystein | ✓ | ✓ | | | | |
| Hepes pufr | ✓ | ✓ | | | | |
| | | | | | | |
| Antibiotika | Směs antibiotik dle 90/429/EEC | Směs antibiotik dle 90/429/EEC | Směs antibiotik dle 90/429/EEC | Směs antibiotik dle 90/429/EEC | Neuveveno | Neuveveno |

Pozn.: U Tekutého koncentrátu 2 byla navážka o 50 % vyšší než u Tekutého koncentrátu 1, složení a obsah antibiotik byl stejný

Složení je orientační, na obalech není uvedeno

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

V testovaných vzorcích kančího spermatu byly nejčastěji se vyskytujícími mikroorganismy: *E. coli*, *Proteus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii subsp. cohnii*, *Staphylococcus cohnii subsp. urealyticum*, *Staphylococcus simulans*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Chryseobacterium gleum*, *Moraxella canis*. U některých vzorků byla prokázána přítomnost plísní.

Bresciani a kol. (2014) uvádí jako nejčastěji se vyskytující mikroorganismy v kančím spermatu *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* a *Pseudomonas aeruginosa*. Gaczarzewicz a kol. (2016) uvádí, jako nejčastější kontaminanty bakterie rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Pseudomonas*. Martín a kol. (2010) uvádí jako nejčastější kontaminanty *E. coli*, *Proteus spp.* a *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*

Gaczarzewicz a kol. (2016) uvádí přítomnost bakteriální kontaminace v koncentraci 80 až 370 CFU/ml. Nými testované nativní vzorky kančího spermatu obsahovaly 1. den testování nejméně $1 \cdot 10^3$ CFU/ml a nejvíce $2,2 \cdot 10^5$ CFU/ml. Počet bakterií v nativním spermatu se během 3 nebo 7 dnů testování měnil.

3.1 Působení BTS ředidla a thiosíranu sodného

Kančí sperma č. 1 zahrnovalo 16 vzorků, které byly naředěny ředidlem BTS a thiosíranem sodným o různé koncentraci, jak uvádí tabulka 4. Vzorky byly testovány po dobu 3 po sobě následujících dnů.

Počet bakterií ve vzorku nativního semene byl 1. den $2,2 \cdot 10^4$ CFU/ml. Jak je vidět na grafu 1, k významnému snížení počtu bakterií došlo u vzorků 2 (< 10 CFU/ml), 3 (< 10 CFU/ml), 4 (< 10 CFU/ml), které obsahovaly ředidlo BTS s antibiotiky. Naopak k nejmenšímu snížení počtu bakterií došlo u vzorků 8 ($5,7 \cdot 10^4$ CFU/ml), 9 ($8,5 \cdot 10^4$ CFU/ml), které obsahovaly ředidlo a thiosíran sodný v nejnižší testované koncentraci 3,022 mM. U vzorku 10 došlo ke kontaminaci a nebylo jej tedy možné hodnotit.

Nativní vzorek kančího spermatu obsahoval 2. den testování $2,1 \cdot 10^4$ CFU/ml. K největšímu snížení počtu bakterií došlo opět u vzorků 2,3 a 4, kdy u všech těchto vzorků

byl počet < 10 CFU/ml. U vzorků 11 ($3,3 \cdot 10^3$ CFU/ml) a 12 ($5,5 \cdot 10^3$ CFU/ml), které obsahovaly ředidlo a thiosíran sodný 4,029 mM, došlo k nejmenšímu snížení počtu bakterií (viz graf 2).

Během 3. dne testování obsahoval vzorek nativního spermatu $9,9 \cdot 10^3$ CFU/ml. Počet bakterií v nativním spermatu byl 1. a 2. den testování srovnatelný, 3. den došlo k mírnému snížení počtu bakterií. Vzorky 2, 3, 4 obsahovaly < 10 CFU/ml. U nich došlo opět k největšímu snížení počtu bakterií, jak je vidět na grafu 3.

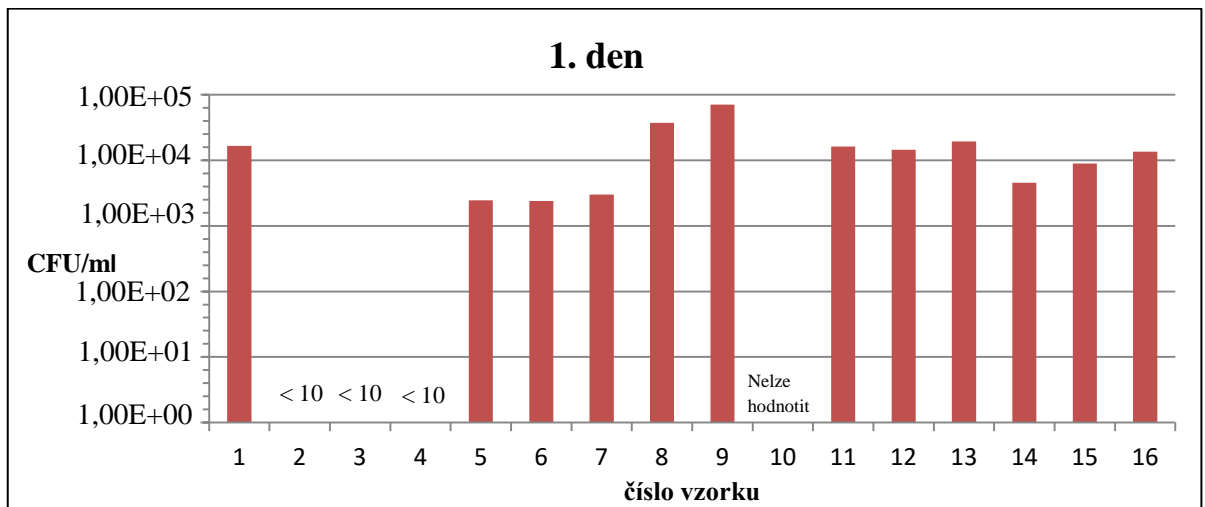
Během 3 dnů testování se počet bakterií v nativním vzorku spermatu měnil jen minimálně. Nejvyšší účinek inhibice byl zaznamenán u vzorků 2,3,4, které obsahovaly ředidlo BTS s přidavkem antibiotik, a to ve všech 3 dnech.

Nebyly nalezeny žádné vědecké studie, které by popisovali inhibiční účinnost thiosíranu sodného na bakterie. Výsledky tedy nebylo možné porovnat s žádnou dostupnou literaturou.

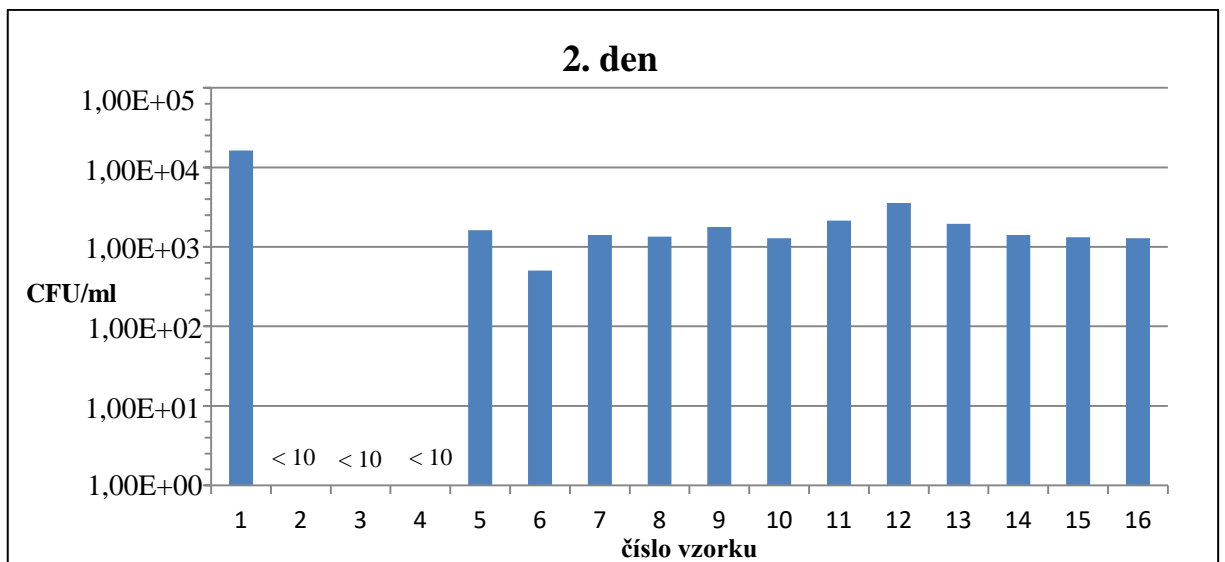
Tabulka 5: Složení vzorků kančího spermatu č. 1

| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|--------------|---|----------------------|
| 1 | Nativní semeno | bez ředidla |
| 2 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:2 |
| 3 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:4 |
| 4 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:8 |
| 5 | Ředidlo BTS bez antibiotik a thiosíranu sodného | 1:2 |
| 6 | Ředidlo BTS bez antibiotik a thiosíranu sodného | 1:4 |
| 7 | Ředidlo BTS bez antibiotik a thiosíranu sodného | 1:8 |
| 8 | Ředidlo + thiosíran sodný 3,022mM | 1:2 |
| 9 | Ředidlo + thiosíran sodný 3,022mM | 1:4 |
| 10 | Ředidlo + thiosíran sodný 3,022mM | 1:8 |
| 11 | Ředidlo + thiosíran sodný 4,029mM | 1:2 |
| 12 | Ředidlo + thiosíran sodný 4,029mM | 1:4 |
| 13 | Ředidlo + thiosíran sodný 4,029mM | 1:8 |
| 14 | Ředidlo + thiosíran sodný 5,036mM | 1:2 |
| 15 | Ředidlo + thiosíran sodný 5,036mM | 1:4 |
| 16 | Ředidlo + thiosíran sodný 5,036mM | 1:8 |

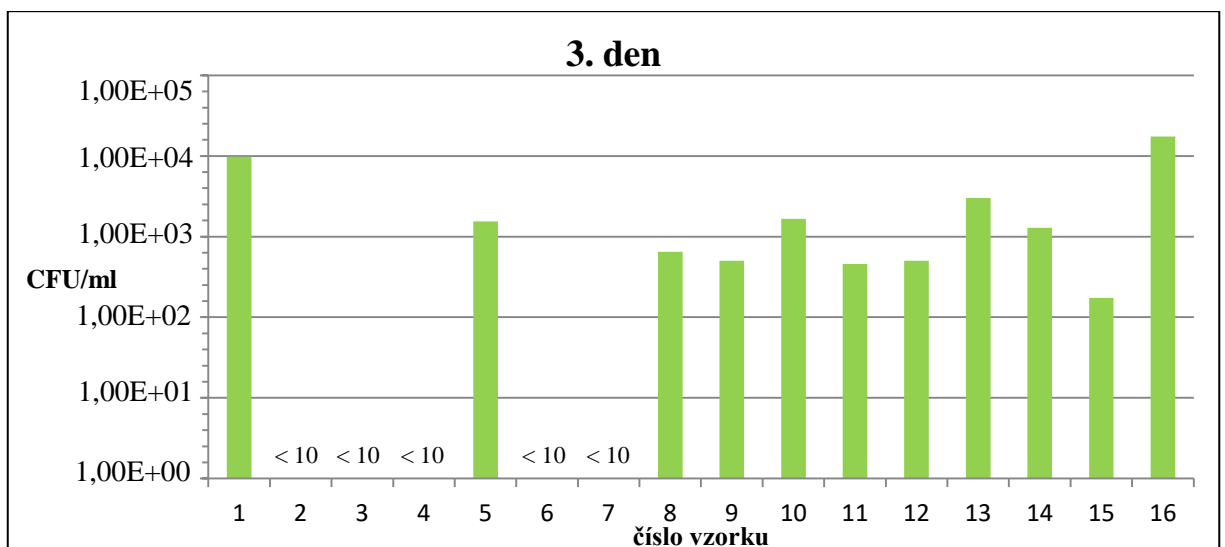
Graf 1: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 1 – 1. den



Graf 2: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 1 – 2. den



Graf 3: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 1 – 3. den



3.2 Působení BTS ředidla a koloidního zinku

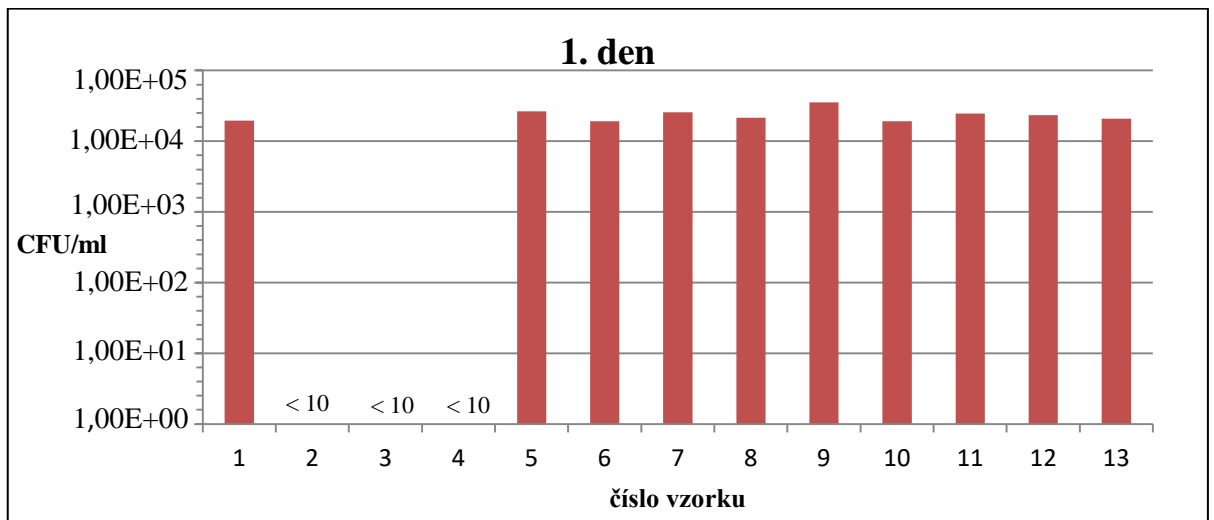
Kančí sperma č. 2 zahrnovalo 13 vzorků, které byly testovány 3 po sobě následující dny. Tyto vzorky byly ředěny ředidlem BTS a ředidlem s různým obsahem koloidního zinku, jak uvádí tabulka 5. Testované množství 0,1 ml obsahovalo 0,1708 mg síranu zinečnatého heptahydrátu a 2,0138 mg vitamínu C. Testované množství 0,2 ml obsahovalo 0,3416 mg síranu zinečnatého heptahydrátu a 4,0276 mg vitamínu C.

Počet bakterií ve vzorku nativního semen byl 1. den $2,9 \cdot 10^4$ CFU/ml, 2. den $4,7 \cdot 10^4$ CFU/ml a 3. den byl nárůst kolonií nepočitatelný (tzn. > 300 kolonií), jak je vidět na grafech 4, 5 a 6. Počet bakterií v nativním kančím spermatu každý den stoupal. 3. den zůstávala v nativním vzorku přítomna především *E. coli* a *Proteus sp.* K významné inhibici bakterií došlo pouze u vzorků 2,3,4 u nichž byl počet kolonií < 10 CFU/ml, a to ve všech 3 dnech. Tyto vzorky obsahovaly ředidlo BTS a směs antibiotik. Koloidní zinek, jehož účinnost byla testována u vzorků 8 – 13, významně nesnížil počet bakterií ve vzorcích během žádného dne testování.

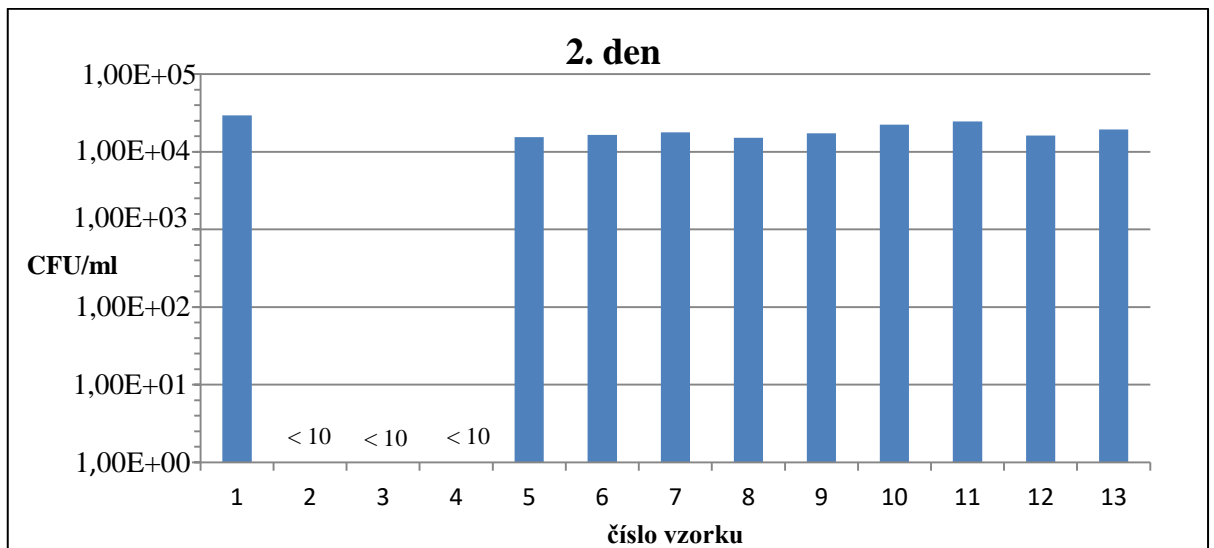
Tabulka 6: Složení vzorků kančího spermatu č. 2

| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|--------------|---|----------------------|
| 1 | Nativní semeno | bez ředidla |
| 2 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:2 |
| 3 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:4 |
| 4 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:8 |
| 5 | Ředidlo BTS bez antibiotik a koloidního zinku | 1:2 |
| 6 | Ředidlo BTS bez antibiotik a koloidního zinku | 1:4 |
| 7 | Ředidlo BTS bez antibiotik a koloidního zinku | 1:8 |
| 8 | Ředidlo + koloidní zinek 0,1ml/10 ml | 1:2 |
| 9 | Ředidlo + koloidní zinek 0,1ml/10 ml | 1:4 |
| 10 | Ředidlo + koloidní zinek 0,1ml/10 ml | 1:8 |
| 11 | Ředidlo + koloidní zinek 0,2ml/10 ml | 1:2 |
| 12 | Ředidlo + koloidní zinek 0,2ml/10 ml | 1:4 |
| 13 | Ředidlo + koloidní zinek 0,2ml/10 ml | 1:8 |

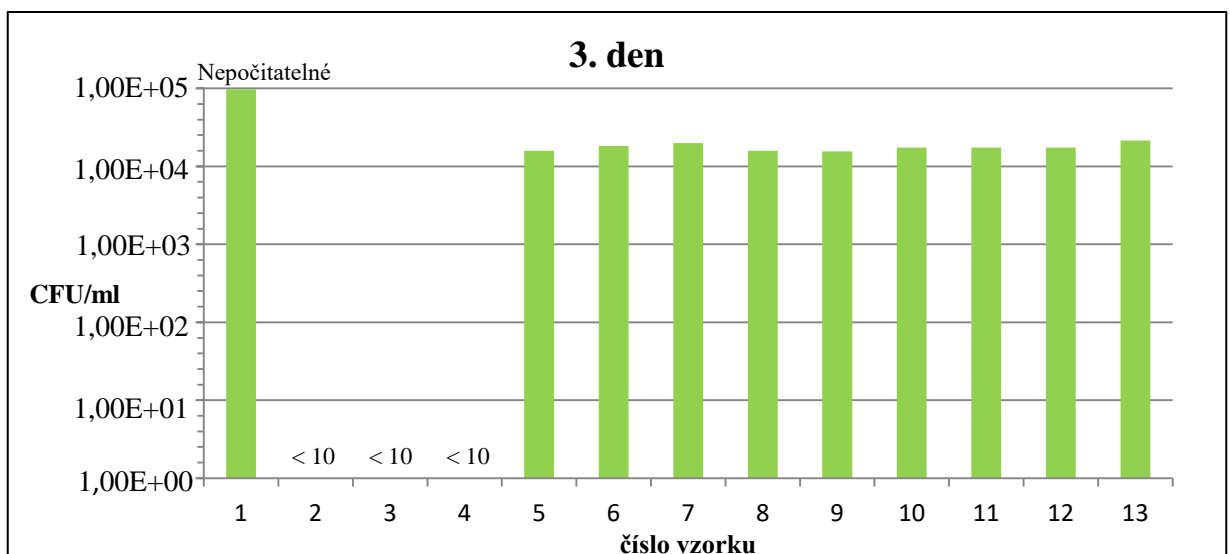
Graf 4: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 2 – 1. den



Graf 5: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 2 – 2. den



Graf 6: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 2 – 3. den



Faiz a kol. (2011) uvádí, že zinek zcela inhiboval růst všech testovaných patogenů (*Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, enteropatogenní *E. coli*, *Vibrio cholerae*) a většina z nich byla inhibována v koncentracích 0,06 – 0,5 mg/ml. Z toho 61 % bakterií nerostlo při koncentraci nad 0,25 mg/ml. Většina izolátů rodu *Salmonella* byla zcela inhibována při koncentraci 0,25 mg/ml. 4 % enteropatoogenních *E. coli* vykazovala MIC > 0,03 mg/ml a < 0,06 mg/ml. 5 % *Schigella flexneri* bylo inhibováno při koncentraci 0,125 mg/ml.

Ve studii Södeberg a kol. (1990) bylo zjištěno, že Gram-pozitivní bakterie byly nejcitlivější bakteriální skupina na ionty zinku. Gram-negativní aerobní bakterie obvykle nebyly inhibovány ani při nejvyšší testované koncentraci 1024 µl/ml.

Kaur a kol. (2015) ve své studii uvádí, že standardní kmen *E. coli* nebyl schopen prvních 32 dní růst při koncentraci zinku v peptonu nad 30 ppm. Dále uvádí, že se kmen následně stal tolerantní k vyšším koncentracím zinku, a to 40-50 ppm v 50 dnech. A v 60 dnech byl kmen rezistentní ke koncentracím 60-70 ppm.

Námi testované koncentrace síranu zinečnatého heptahydrátu byly 0,1708 mg/ml a 0,3416 mg/ml. Ani jedna testovaná koncentrace nebyla účinná v žádném dni testování.

3.3 Působení BTS ředidla a kyseliny gallové

Kančí sperma č. 3 zahrnovalo 16 vzorků, které byly testovány 3 po sobě následující dny. Vzorky byly ředěny BTS ředidlem s různým obsahem kyseliny gallové, jak je vidět v tabulce 6.

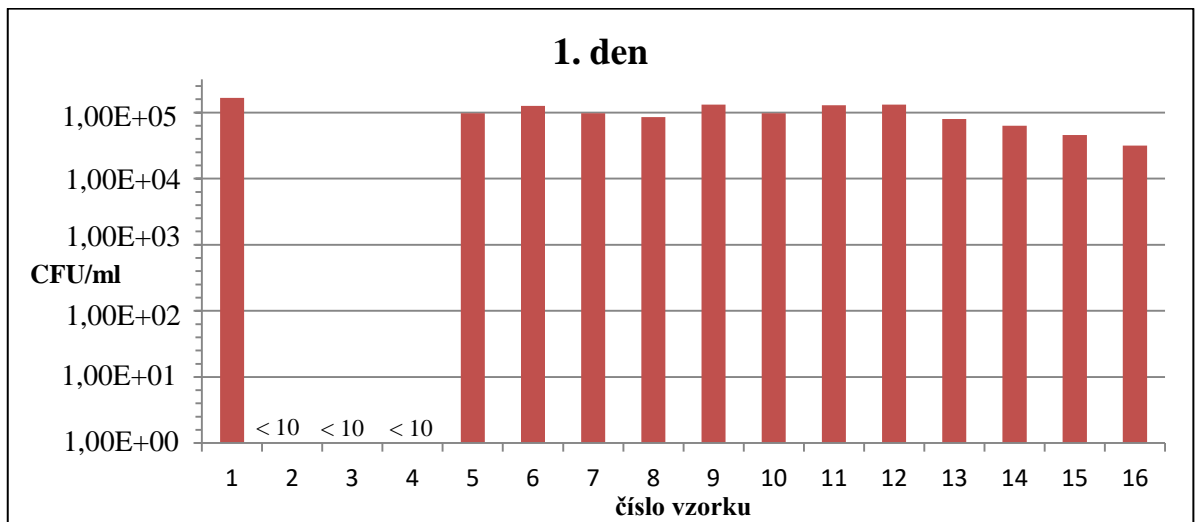
Počet bakterií ve vzorku nativního semene byl 1. den testování $2,2 \cdot 10^5$ CFU/ml. Během 1. dne byl významně snížen počet bakterií pouze u vzorků s obsahem antibiotik, tedy u vzorků 2, 3, 4, kde byl počet bakterií < 10 CFU/ml (graf 7). 2. den testování byl počet bakterií v nativním vzorku semene nepočítatelný. K významnému snížení počtu bakterií došlo opět u vzorků spermatu s přídatkem antibiotik (< 10 CFU/ml). Jak je vidět na grafu 8, u vzorků 5-16 s obsahem kyseliny gallové nedošlo během 2. dne testování k významnému poklesu počtu bakterií, i když pokles přibližně o 0,5 řádu byl zaznamenán rovnoměrně u všech vzorků.

Během 3. dne byl počet bakterií v nativním vzorku opět nepočítatelný. Ke snížení počtu na < 10 CFU/ml došlo u vzorků s antibiotiky, jak ukazuje graf 9. U ostatních vzorků (tj. 5-16) došlo opět k rovnoměrnému snížení, které však nebylo významné. Výjimkou je vzorek 14, který byl nepočítatelný. U nepočítatelných vzorků byl masivní nárůst bakterií *E. coli*.

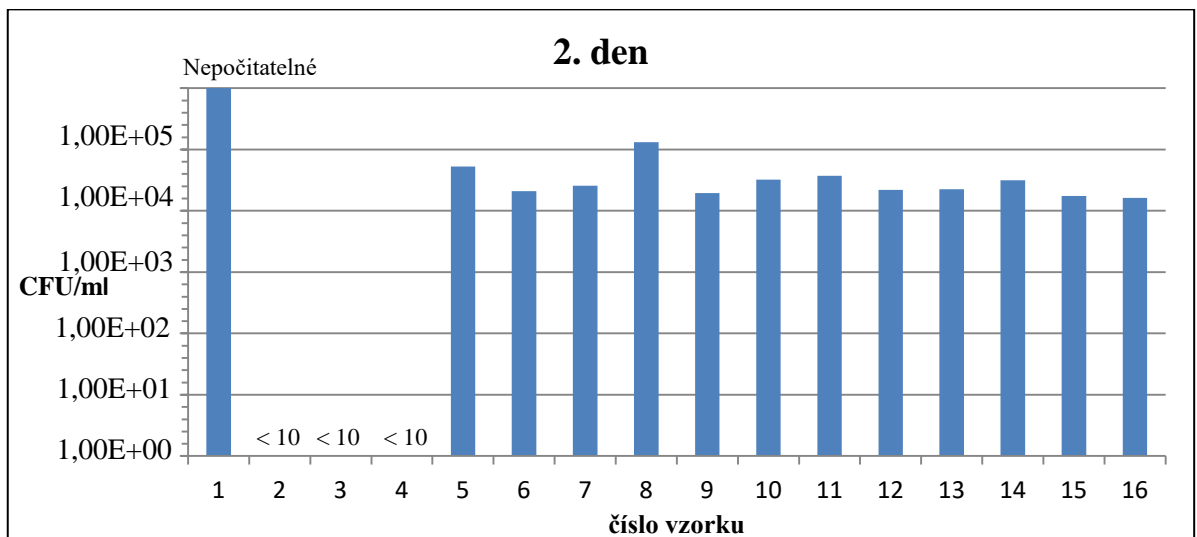
Tabulka 7: Složení vzorků kančího spermatu č. 3

| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|---------------------|---|-----------------------------|
| 1 | Nativní semeno | bez ředidla |
| 2 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:2 |
| 3 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:4 |
| 4 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:8 |
| 5 | Ředidlo BTS bez antibiotik a kyseliny gallové | 1:2 |
| 6 | Ředidlo BTS bez antibiotik a kyseliny gallové | 1:4 |
| 7 | Ředidlo BTS bez antibiotik a kyseliny gallové | 1:8 |
| 8 | Ředidlo + kyselina gallová 0,03g/10 ml | 1:2 |
| 9 | Ředidlo + kyselina gallová 0,03g/10 ml | 1:4 |
| 10 | Ředidlo + kyselina gallová 0,03g/10 ml | 1:8 |
| 11 | Ředidlo + kyselina gallová 0,035g/10 ml | 1:2 |
| 12 | Ředidlo + kyselina gallová 0,035g/10 ml | 1:4 |
| 13 | Ředidlo + kyselina gallová 0,035g/10 ml | 1:8 |
| 14 | Ředidlo + kyselina gallová 0,04g/10 ml | 2:2 |
| 15 | Ředidlo + kyselina gallová 0,04g/10 ml | 2:4 |
| 16 | Ředidlo + kyselina gallová 0,04g/10 ml | 2:8 |

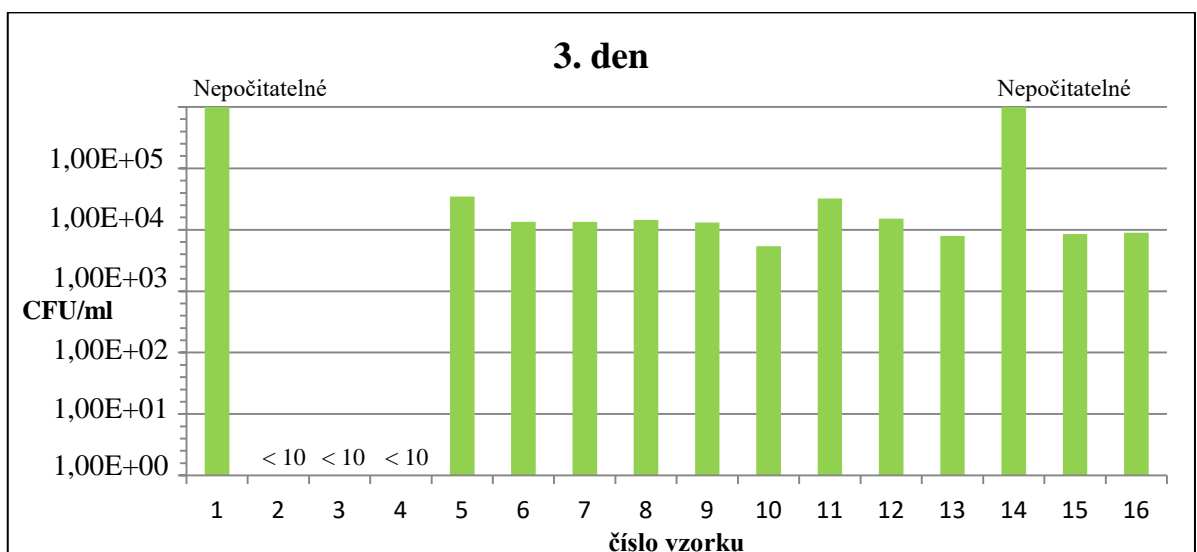
Graf 7: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 3 – 1. den



Graf 8: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 3 – 2. den



Graf 9: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 3 – 3. den



Borges a kol. (2013) studovali účinnost kyseliny gallové na bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*. Uvádí, že MIC byla pro *Pseudomonas aeruginosa* 500 µg/ml, *E. coli* 1500 µg/ml, *Staphylococcus aureus* 1750 µg/ml a pro *Listeria monocytogenes* 2000 µg/ml. MBC byla pro *E. coli* 5000 µg/ml, *Staphylococcus aureus* 5250 µg/ml, *Listeria monocytogenes* 5500 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* 500 µg/ml. Dále uvádí, že kyselina gallová vedla k nevratným změnám ve vlastnostech membrány (intra- a extracelulární propustnost a fyzikálně-chemické vlastnosti), změnám hydrofobicity, snížení negativního povrchového náboje, tvorbě pórů v membráně buňky s následným únikem základních intracelulárních složek. Studie celkově zdůrazňuje potenciál molekul rostlinného původu jako trvalého zdroje širokého spektra antimikrobiálních produktů.

Díaz-Gómez a kol. (2014) uvádí, že inhibiční účinek kyseliny gallové na růst bakterií se projevil při koncentraci 2,5 mg/ml. Úplná inhibice pak byla pozorována při koncentraci 3,5 mg/ml a více. Stanovili, že minimální inhibiční koncentrace kyseliny gallové, která způsobí inhibici růstu 99 % *E. coli* je 3,25 mg/ml.

Z námi testovaných koncentrací kyseliny gallové došlo k největší inhibici mikroorganismů během 3. dne testování, a to v koncentracích 3 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4 mg/ml. Účinné byly tedy koncentrace, kde byl přítomen nejvyšší podíl ředidla s obsahem kyseliny gallové. Účinek kyseliny gallové se projevil až po 3 dnech uchovávání spermatu. Přesto nebyla tato inhibice významná, došlo ke snížení přibližně o 1 řád CFU/ml. Pro významnou inhibici je potřeba snížení minimálně o 4 řády CFU/ml.

3.4 Působení BTS ředidla a medu

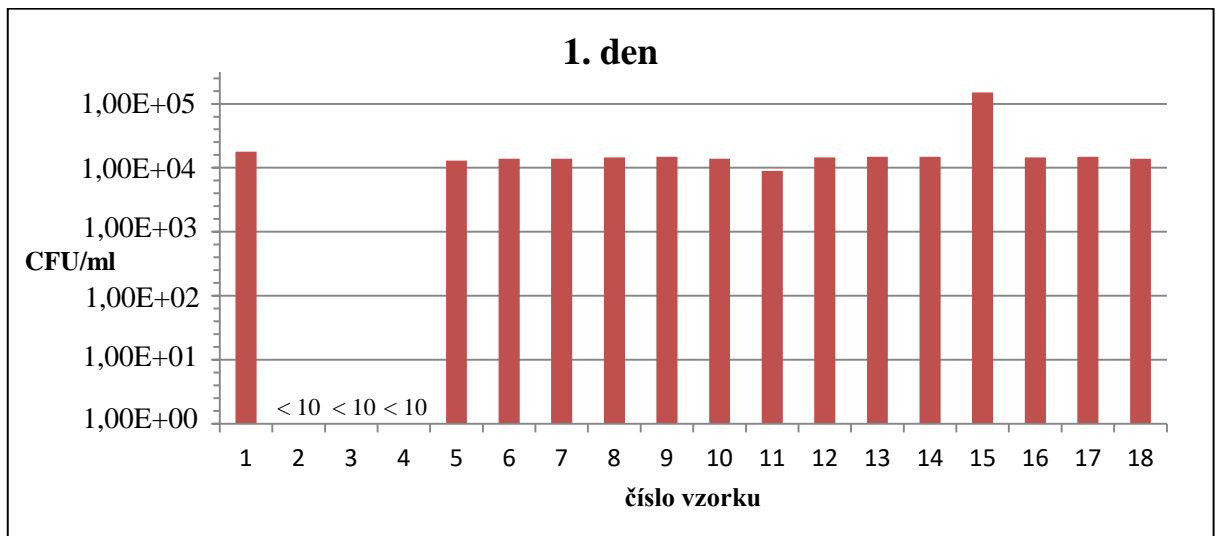
U kančího spermatu č. 4 bylo testováno celkem 18 vzorků, které byly ředěné krátkodobým ředidlem s obsahem medu, kyseliny gallové, koloidního zinku a thiosíranu sodného, jak je vidět v tabulce 7. Vzorky byly hodnoceny ve 3 po sobě následujících dnech.

Počet bakterií v nativním vzorku 1. den testování byl $2,5 \cdot 10^4$ CFU/ml. U vzorků 2, 3, 4, které obsahovaly antibiotika, došlo k významnému snížení počtu bakterií na < 10 CFU/ml, jak ukazuje graf 10. U vzorků 5-18 nedošlo k inhibici, počet bakterií se rovnal počtu v nativním vzorku spermatu. Vzorek 15 byl zřejmě kontaminován, oproti ostatním vzorkům zde došlo k navýšení počtu bakterií. 2. den testování bylo v nativním vzorku $2,7 \cdot 10^4$ CFU/ml. Ani během 2. dne testování nedošlo k významné inhibici počtu bakterií, kromě vzorků s antibiotiky (graf 11). Na grafu 12 je vidět, že 3. den testování byl nativní vzorek již nepočítatelný. Vzorky 2, 3, 4 obsahovaly i 3. den < 10 CFU/ml. Pozorována byla také inhibice u vzorků 7 a 10, i když nebyla významná (graf 12).

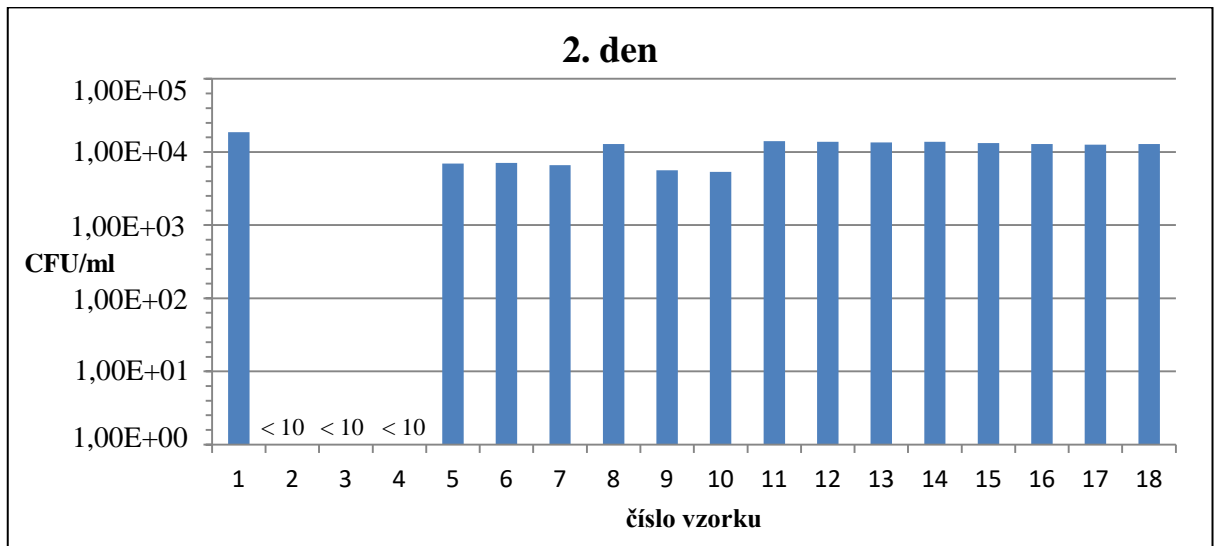
Tabulka 8: Složení vzorků kančího spermatu č. 4

| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|--------------|--|----------------------|
| 1 | Nativní semeno | bez ředidla |
| 2 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:2 |
| 3 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:4 |
| 4 | Ředidlo BTS s antibiotiky | 1:8 |
| 5 | Ředidlo BTS bez antibiotik a testovaných látek | 1:2 |
| 6 | Ředidlo BTS bez antibiotik a testovaných látek | 1:4 |
| 7 | Ředidlo BTS bez antibiotik a testovaných látek | 1:8 |
| 8 | Ředidlo + med 0,8g/50 ml | 1:2 |
| 9 | Ředidlo + med 0,8g/50 ml | 1:4 |
| 10 | Ředidlo + med 0,8g/50 ml | 1:8 |
| 11 | Ředidlo + kyselina gallová 0,030g/20 ml | 1:4 |
| 12 | Ředidlo + kyselina gallová 0,035g/20 ml | 1:4 |
| 13 | Ředidlo + kyselina gallová 0,040g/20 ml | 1:4 |
| 14 | Ředidlo + koloidní zinek 0,1 ml/20 ml | 1:4 |
| 15 | Ředidlo + koloidní zinek 0,2 ml/20 ml | 1:4 |
| 16 | Ředidlo + thiosíran sodný 0,015g/20 ml | 1:4 |
| 17 | Ředidlo + thiosíran sodný 0,020g/20 ml | 1:4 |
| 18 | Ředidlo + thiosíran sodný 0,025g/20 ml | 1:4 |

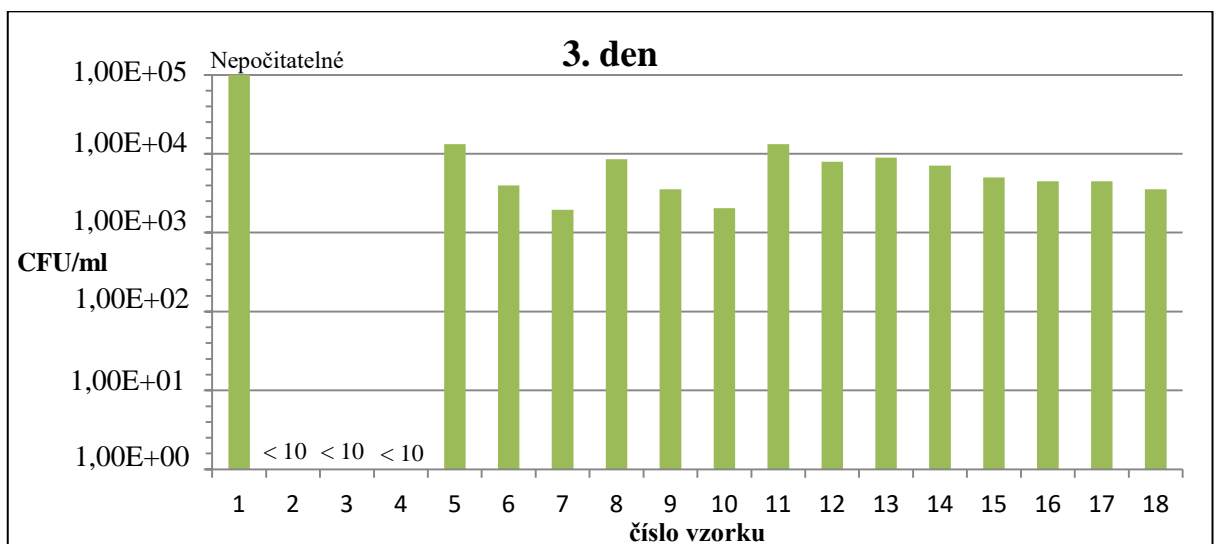
Graf 10: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 4 – 1. den



Graf 11: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 4 – 2. den



Graf 12: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 4 – 3. den



Mahendran a Kumarasamy (2015) zkoumali účinnost celkem 12 vzorků medu různého původu na gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* a na gram-negativní bakterie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*. Uvádí, že *Staphylococcus aureus* byl nejvíce citlivý ke všem druhům medu. Naopak *Pseudomonas aeruginosa* byl nejméně citlivý ke všem vzorkům medu. Z výsledků studie, je zřejmé, že gram-pozitivní bakterie jsou k medu citlivé více než bakterie gram-negativní.

Mohapatra a kol. (2011) uvádí, že hodnota MIC pro 5 testovaných organismů *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Salmonella Typhi* byla 625 µg/ml. Hodnota MBC u obou testovaných vzorků medu byla v rozmezí 625 – 2500 µg/ml. Hodnoty MBC u nezpracovaného medu byly pro *Salmonella Typhi* 1250 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* 1250 µg/ml, *E. coli* 2500 µg/ml, *Micrococcus luteus* 1250 µg/ml, *Bacillus cereus* 625 µg/ml, *Bacillus subtilis* 625 µg/ml. Hodnoty MBC zpracovaného medu byly pro *Salmonella Typhi* 2500 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* 1250 µg/ml, *E. coli* 2500 µg/ml, *Micrococcus luteus* 1250 µg/ml, *Bacillus cereus* 1250 µg/ml a *Bacillus subtilis* 2500 µg/ml.

Al-Naama (2009) ve své studii uvádí, že MIC medu byla pro *Pseudomonas spp.* 1,5 mg/ml, pro *E. coli* 6,25 mg/ml a pro *Staphylococcus aureus* 12,5 mg/ml. Dále uvádí, že med vykazoval větší inhibiční zónu než tetracyklin a gentamycin u *Pseudomonas spp.* a *E. coli* (viz. tabulka 6). U *Staphylococcus aureus* byla velikost inhibiční zóny medu a tetracyklinu shodná.

Tabulka 9: Antibakteriální aktivita čistého medu, gentamycinu, tetracyklinu (Al-Naama, 2009)

| Bakterie | Inhibiční zóna (mm) | | |
|------------------------------|---------------------|------------|-------------|
| | Med 100 % | Gentamycin | Tetracyklin |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 | 18 | 20 |
| <i>Escherichia coli</i> | 22 | 20 | 18 |
| <i>Pseudomonas spp.</i> | 23 | 16 | 0 |

3.5 Působení ředidel Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS

Kančí sperma č. 5 zahrnovalo 13 vzorků, které byly ředěny ředidly Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS, jak je vidět v tabulce 9. Vzorky byly testovány 1., 3. a 7. den skladování.

Nativní sperma obsahovalo 1. den testování $5,2 \cdot 10^4$ CFU/ml. Jak je vidět na grafu 13, k inhibici pod < 10 CFU/ml došlo u vzorků 10 a 11, které obsahovaly ředidlo Vitasem LD. Na grafu 13 je dále vidět, že pokles počtu bakterií přibližně o 1 řád byl pozorován u vzorků 2 a 3 (ředidlo Androhep) a vzorků 4, 5 (ředidlo VIP 3).

Po třech dnech skladování byl počet bakterií v nativním vzorku nepočítatelný. Vzorky 2, 3 (ředidlo Androhep), 10 a 11 (Vitasem LD) obsahovaly < 10 CFU/ml (graf 14).

7. den testování byl nativní vzorek kančího spermatu opět nepočítatelný. Významné snížení bakterií na < 10 CFU/ml zůstalo u vzorků 2, 3, 10 a 11. K masivnímu nárůstu bakterií došlo u vzorků 4, 5, 12 a 13, které byly nepočítatelné, jak je vidět na grafu 15. Nepočítatelné vzorky obsahovaly souvislý nárůst *E. coli*.

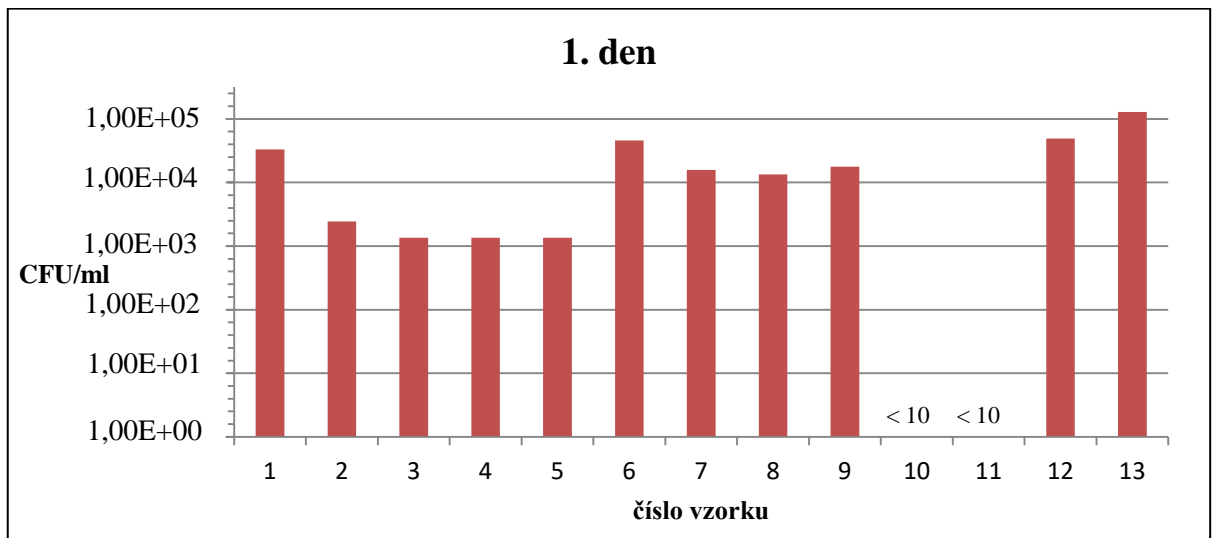
Tabulka 10: Složení vzorků kančího spermatu č. 5

| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|--------------|---|----------------------|
| 1 | Nativní semeno | bez ředidla |
| 2 | Androhep ¹ – dlouhodobé ředidlo | 1:2 |
| 3 | Androhep ¹ – dlouhodobé ředidlo | 1:10 |
| 4 | VIP 3 ² – krátkodobé ředidlo 3 dny | 1:2 |
| 5 | VIP 3 ² – krátkodobé ředidlo 3 dny | 1:10 |
| 6 | VIP 5 ³ – dlouhodobé ředidlo 5 dní | 1:2 |
| 7 | VIP 5 ³ – dlouhodobé ředidlo 5 dní | 1:10 |
| 8 | VIP 7 ⁴ – dlouhodobé ředidlo 7 dní | 1:2 |
| 9 | VIP 7 ⁴ – dlouhodobé ředidlo 7 dní | 1:10 |
| 10 | Vitasem LD ⁵ – dlouhodobé ředidlo | 1:2 |
| 11 | Vitasem LD ⁵ – dlouhodobé ředidlo | 1:10 |
| 12 | BTS bez antibiotik – krátkodobé ředidlo | 1:2 |
| 13 | BTS bez antibiotik – krátkodobé ředidlo | 1:10 |

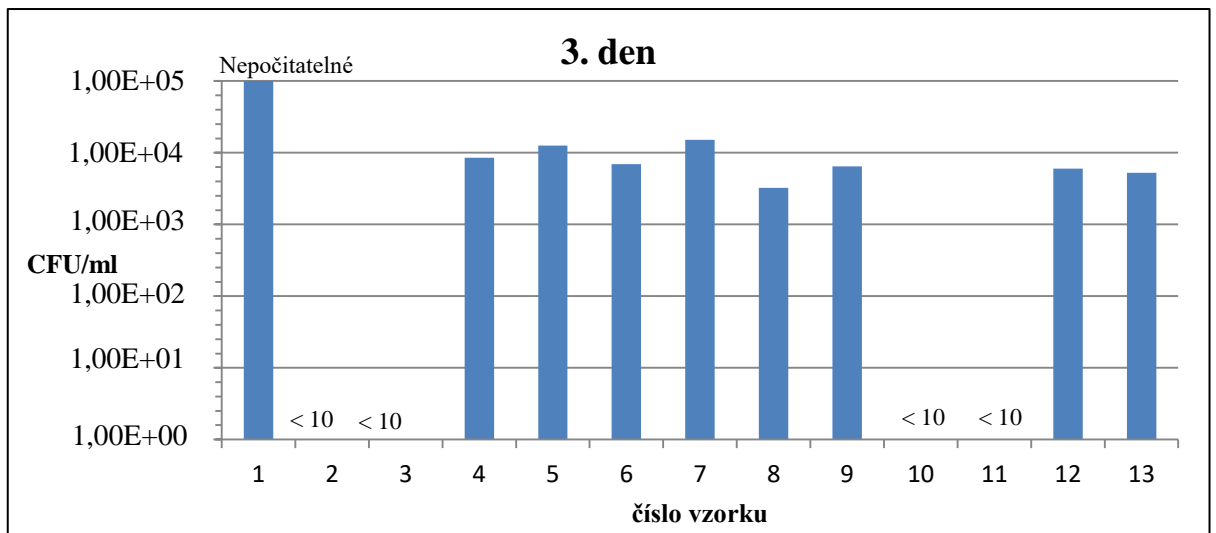
Orientační složení antibiotik: 1 gentamycin
2 gentamycin sulfát, amoxicilin
3 gentamycin sulfát, amoxicilin, enrofloxacin
4 neomycin sulfát, polymyxin, enrofloxacin, apramycin
5 směs antibiotik dle směrnice 90/429/EEC

Pozn.: Složení antibiotik je orientační, na obalech není uvedeno

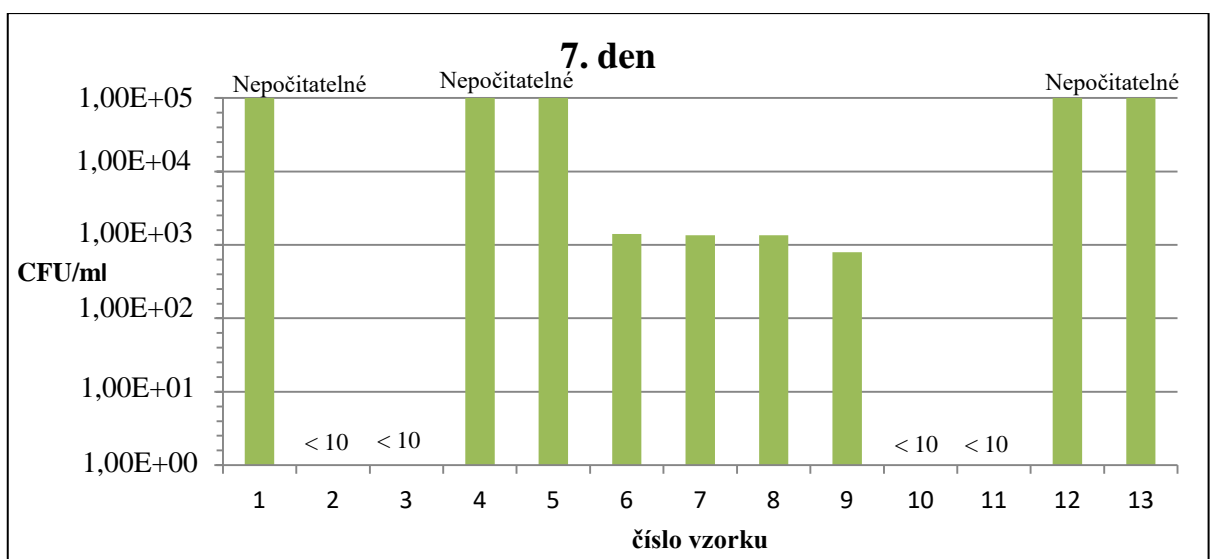
Graf 13: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 5 – 1. den



Graf 14: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 5 – 3. den



Graf 15: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 5 – 7. den



3.6 Působení ředidel Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS

Vzorek kančího spermatu č. 6 byl rozdělen do 13 vzorků, jak je vidět v tabulce 10. Vzorky byly testovány 1., 3. a 7. den skladování.

Počet bakterií ve vzorcích spermatu během 1. dne testování ukazuje graf 16. Během 1. dne testování obsahoval vzorek nativního spermatu $1,1 \cdot 10^3$ CFU/ml. Téměř u všech vzorků, kromě vzorků 6 (VIP 5) a 12 (BTS bez antibiotik), došlo ke snížení počtu bakterií na < 10 CFU/ml. Vzorek 6 obsahoval $5,7 \cdot 10^2$ CFU/ml, vzorek 12 obsahoval $3 \cdot 10^2$ CFU/ml.

Počet bakterií v nativním vzorku se 3. den zvýšil na $3,2 \cdot 10^3$ CFU/ml. Jak ukazuje graf 17, vzorky 2-5 (Androhep, VIP 3) a 7-13 (VIP 5, VIP 7, Vitasem LD, BTS) obsahovaly 3. den < 10 CFU/ml. U vzorku 6 byl nárůst $1,8 \cdot 10^2$ CFU/ml, u vzorku 12 bylo $1,1 \cdot 10^3$ CFU/ml a u vzorku 13 $6,5 \cdot 10^2$ CFU/ml. Vzhledem k tomu, že 1. den testování obsahoval vzorek 13 < 10 CFU/ml, mohlo dojít ke kontaminaci vzorku.

7. den skladování došlo u nativního vzorku k masivnímu nárůstu počtu bakterií, vzorek byl nepočítatelný. Všechny ostatní vzorky, tj. 2-13, obsahovaly < 10 CFU/ml (graf 18). Nepočítatelné vzorky obsahovaly opět souvislý nárůst *E. coli*.

Tabulka 11: Složení vzorků kančího spermatu č. 6

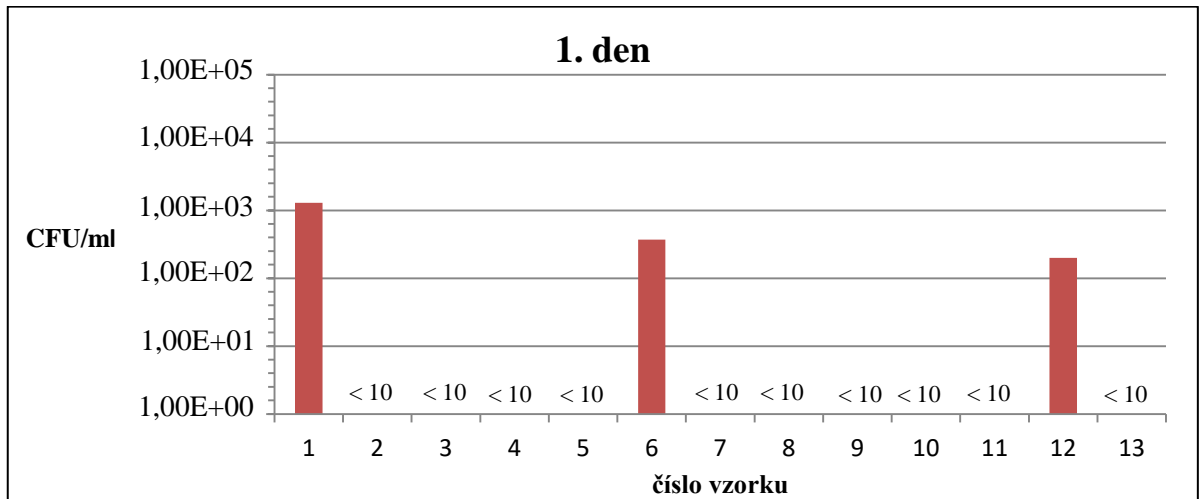
| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|--------------|---|----------------------|
| 1 | Nativní semeno | Bez ředidla |
| 2 | Androhep ¹ – dlouhodobé ředidlo | 1:2 |
| 3 | Androhep ¹ – dlouhodobé ředidlo | 1:10 |
| 4 | VIP 3 ² – krátkodobé ředidlo 3 dny | 1:2 |
| 5 | VIP 3 ² – krátkodobé ředidlo 3 dny | 1:10 |
| 6 | VIP 5 ³ – dlouhodobé ředidlo 5 dní | 1:2 |
| 7 | VIP 5 ³ – dlouhodobé ředidlo 5 dní | 1:10 |
| 8 | VIP 7 ⁴ – dlouhodobé ředidlo 7 dní | 1:2 |
| 9 | VIP 7 ⁴ – dlouhodobé ředidlo 7 dní | 1:10 |
| 10 | Vitasem LD ⁵ – dlouhodobé ředidlo | 1:2 |
| 11 | Vitasem LD ⁵ – dlouhodobé ředidlo | 1:10 |
| 12 | BTS bez antibiotik – krátkodobé ředidlo | 1:2 |
| 13 | BTS bez antibiotik – krátkodobé ředidlo | 1:10 |

Orientační složení antibiotik:

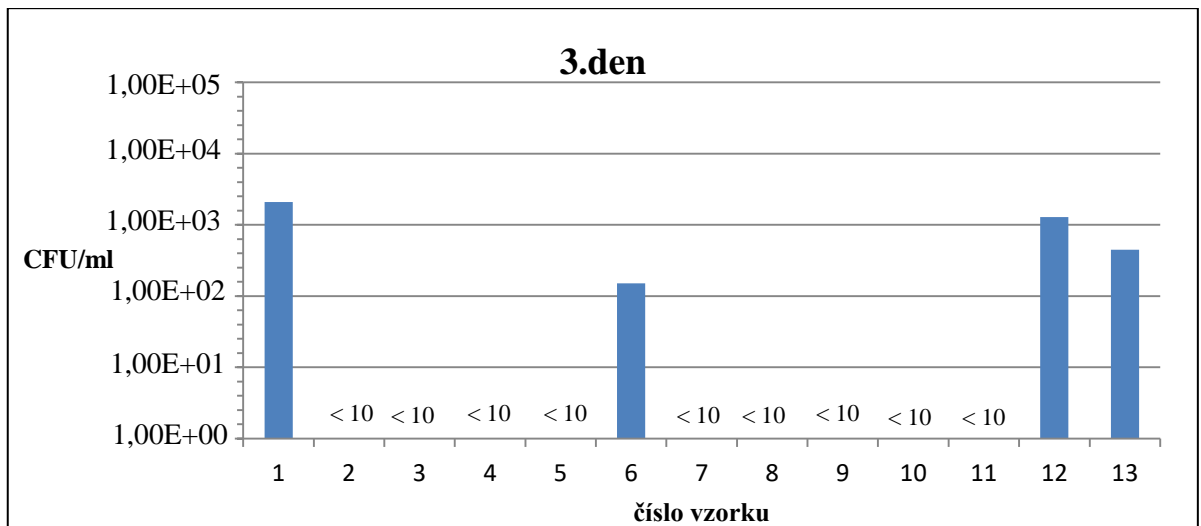
- 1 gentamycin
- 2 gentamycin sulfát, amoxicilin
- 3 gentamycin sulfát, amoxicilin, enrofloxacin
- 4 neomycin sulfát, polymyxin, enrofloxacin, apramycin
- 5 směs antibiotik dle směrnice 90/429/EEC

Pozn.: Složení antibiotik je orientační, na obalech není uvedeno

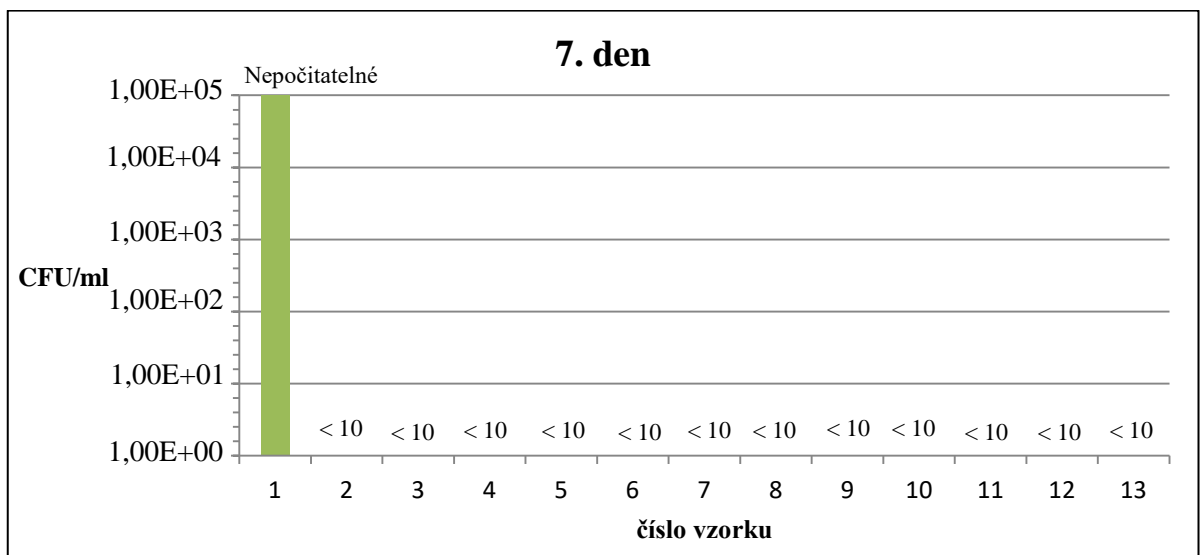
Graf 16: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 6 – 1. den



Graf 17: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 6 – 3. den



Graf 18: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 6 – 7. den



3.7 Působení ředidel Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS

Kančí sperma č. 7 zahrnovalo 13 vzorků s různými ředidly (tabulka 11), které byly testovány 1., 3. a 7. den skladování spermatu.

V nativním vzorku bylo 1. den zjištěno $2 \cdot 10^5$ CFU/ml. K významnému poklesu počtu bakterií nedošlo u žádného vzorku, jak je vidět na grafu 19. Nejvyšší pokles počtu bakterií byl zaznamenán u vzorků 2 (Androhep) a 10 (Vitasem LD), počet se snížil přibližně jen o 1,5 řádu.

3. den došlo u nativního vzorku k masivnímu nárůstu počtu bakterií. Vzorek byl nepočítatelný. Ani 3. den testování nedošlo k významnému snížení počtu bakterií. U vzorků 4 (VIP 3) a 12 (BTS bez antibiotik) došlo dokonce k výraznému nárůstu počtu bakterií (graf 20).

Počet bakterií se nesnížil ani 7. den testování. Graf 21 ukazuje, že u většiny vzorků došlo dokonce k masivnímu nárůstu, tj. vzorky 2, 4, 5, 10, 11, 12, 13 byly nepočítatelné.

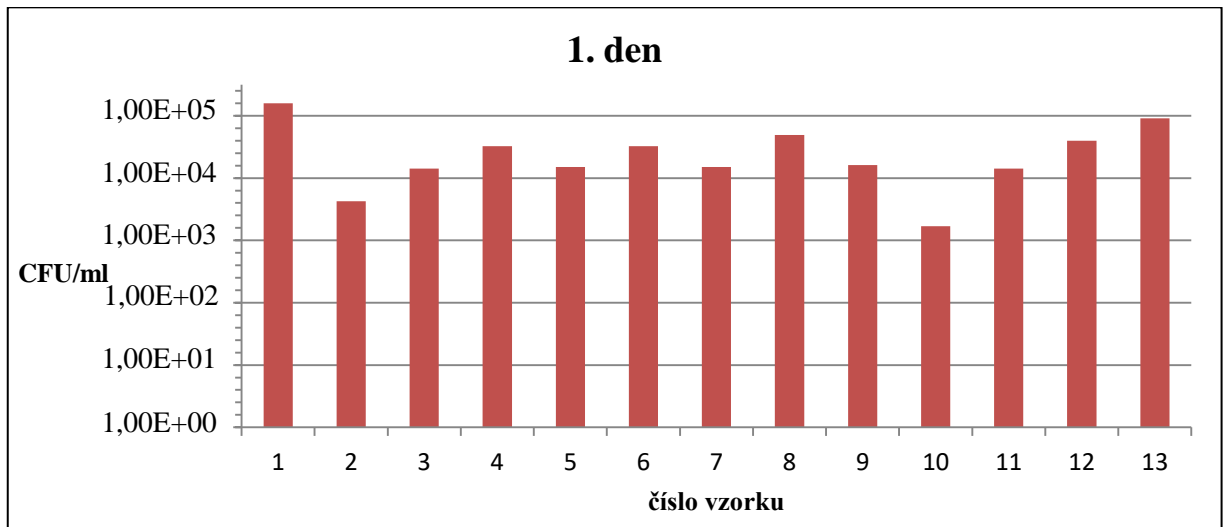
Tabulka 12: Složení vzorků kančího spermatu č. 7

| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|--------------|---|----------------------|
| 1 | Nativní semeno | bez ředidla |
| 2 | Androhep ¹ – dlouhodobé ředidlo | 1:2 |
| 3 | Androhep ¹ – dlouhodobé ředidlo | 1:10 |
| 4 | VIP 3 ² – krátkodobé ředidlo 3 dny | 1:2 |
| 5 | VIP 3 ² – krátkodobé ředidlo 3 dny | 1:10 |
| 6 | VIP 5 ³ – dlouhodobé ředidlo 5 dní | 1:2 |
| 7 | VIP 5 ³ – dlouhodobé ředidlo 5 dní | 1:10 |
| 8 | VIP 7 ⁴ – dlouhodobé ředidlo 7 dní | 1:2 |
| 9 | VIP 7 ⁴ – dlouhodobé ředidlo 7 dní | 1:10 |
| 10 | Vitasem LD ⁵ – dlouhodobé ředidlo | 1:2 |
| 11 | Vitasem LD ⁵ – dlouhodobé ředidlo | 1:10 |
| 12 | BTS bez antibiotik – krátkodobé ředidlo | 1:2 |
| 13 | BTS bez antibiotik – krátkodobé ředidlo | 1:10 |

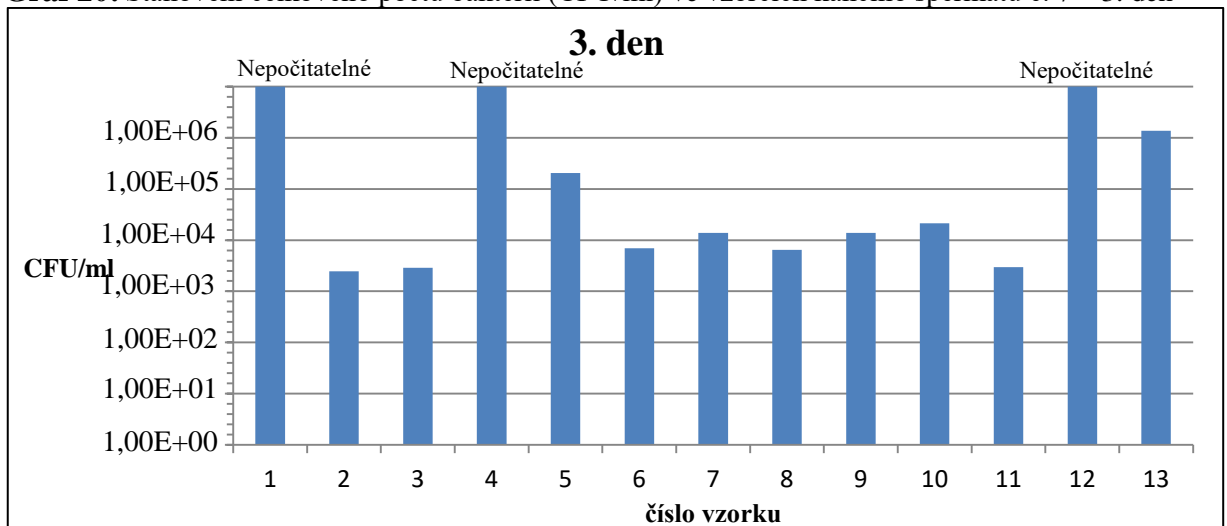
Orientační složení antibiotik: 1 gentamycin
2 gentamycin sulfát, amoxicilin
3 gentamycin sulfát, amoxicilin, enrofloxacin
4 neomycin sulfát, polymyxin, enrofloxacin, apramycin
5 směs antibiotik dle směrnice 90/429/EEC

Pozn.: Složení antibiotik je orientační, na obalech není uvedeno

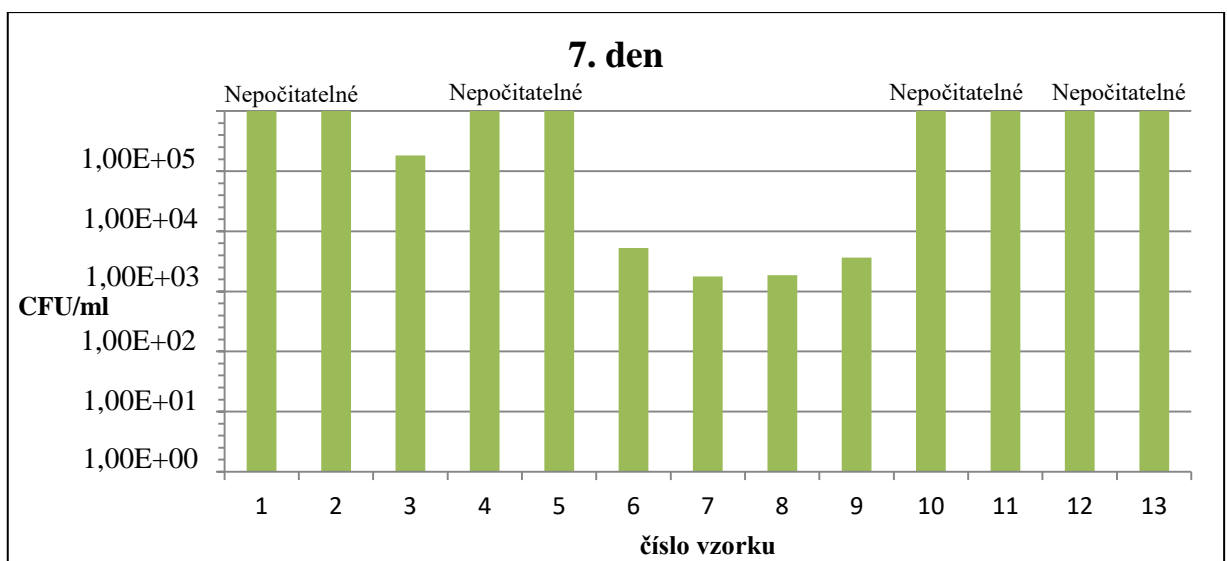
Graf 19: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 7 – 1. den



Graf 20: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 7 – 3. den



Graf 21: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 7 – 7. den



3.8 Působení ředidel Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS

Vzorek spermatu č. 8 byl rozdělen opět do 13 vzorků (tabulka 12) testovaných 1., 3. a 7. den skladování.

U vzorku nativního spermatu byl 1. den zjištěn počet $7,3 \cdot 10^3$ CFU/ml. Jak ukazuje graf 22, k významnému snížení počtu bakterií došlo pouze u vzorků 10 a 11 (< 10 CFU/ml), které obsahovaly dlouhodobé ředidlo Vitasem LD.

3. den masivně vzrostl počet bakterií v nativním vzorku (nepočítatelné). Stejně tomu bylo u vzorku 12 (BTS bez antibiotik), který byl také nepočítatelný. U vzorků 3 (Androhep), 7 (VIP 5), 11 (Vitasem LD) bylo < 10 CFU/ml. U ostatních vzorků nedošlo k významné změně počtu bakterií, jak je vidět na grafu 23.

7. den se výrazně pomnožily bakterie u vzorků 1 (nativ), 2, 4, 5, 10, 11, 12, 13. Tyto vzorky byly nepočítatelné a obsahovaly masivní nárůst *E. coli*. Na grafu 24 je vidět snížení počtu bakterií na < 10 CFU/ml jen u vzorků 7 (VIP 5) a 9 (VIP 7).

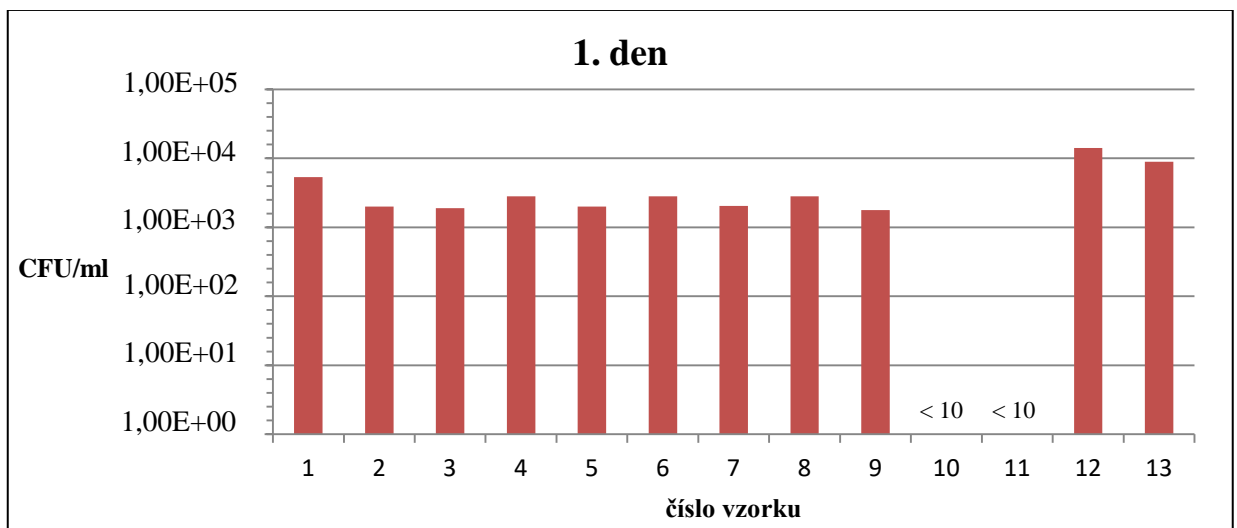
Tabulka 13: Složení vzorků kančího spermatu č. 8

| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|--------------|---|----------------------|
| 1 | Nativní semeno | bez ředidla |
| 2 | Androhep ¹ – dlouhodobé ředidlo | 1:2 |
| 3 | Androhep ¹ – dlouhodobé ředidlo | 1:10 |
| 4 | VIP 3 ² – krátkodobé ředidlo 3 dny | 1:2 |
| 5 | VIP 3 ² – krátkodobé ředidlo 3 dny | 1:10 |
| 6 | VIP 5 ³ – dlouhodobé ředidlo 5 dní | 1:2 |
| 7 | VIP 5 ³ – dlouhodobé ředidlo 5 dní | 1:10 |
| 8 | VIP 7 ⁴ – dlouhodobé ředidlo 7 dní | 1:2 |
| 9 | VIP 7 ⁴ – dlouhodobé ředidlo 7 dní | 1:10 |
| 10 | Vitasem LD ⁵ – dlouhodobé ředidlo | 1:2 |
| 11 | Vitasem LD ⁵ – dlouhodobé ředidlo | 1:10 |
| 12 | BTS bez antibiotik – krátkodobé ředidlo | 1:2 |
| 13 | BTS bez antibiotik – krátkodobé ředidlo | 1:10 |

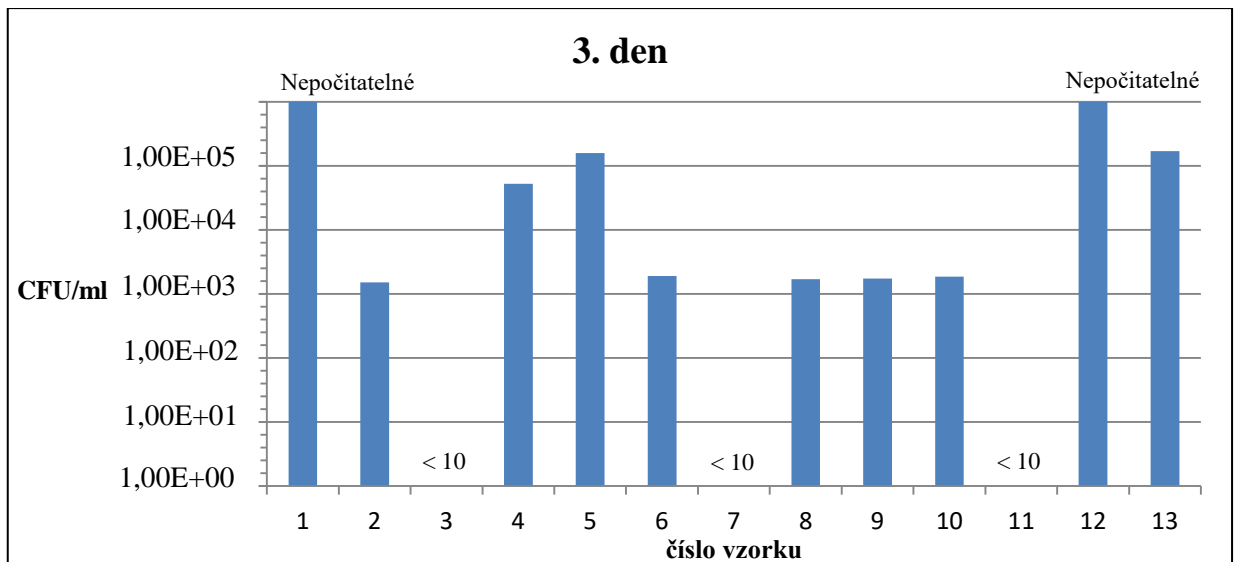
Orientační složení antibiotik: 1 gentamycin
2 gentamycin sulfát, amoxicilin
3 gentamycin sulfát, amoxicilin, enrofloxacin
4 neomycin sulfát, polymyxin, enrofloxacin, apramycin
5 směs antibiotik dle směrnice 90/429/EEC

Pozn.: Složení antibiotik je orientační, na obalech není uvedeno

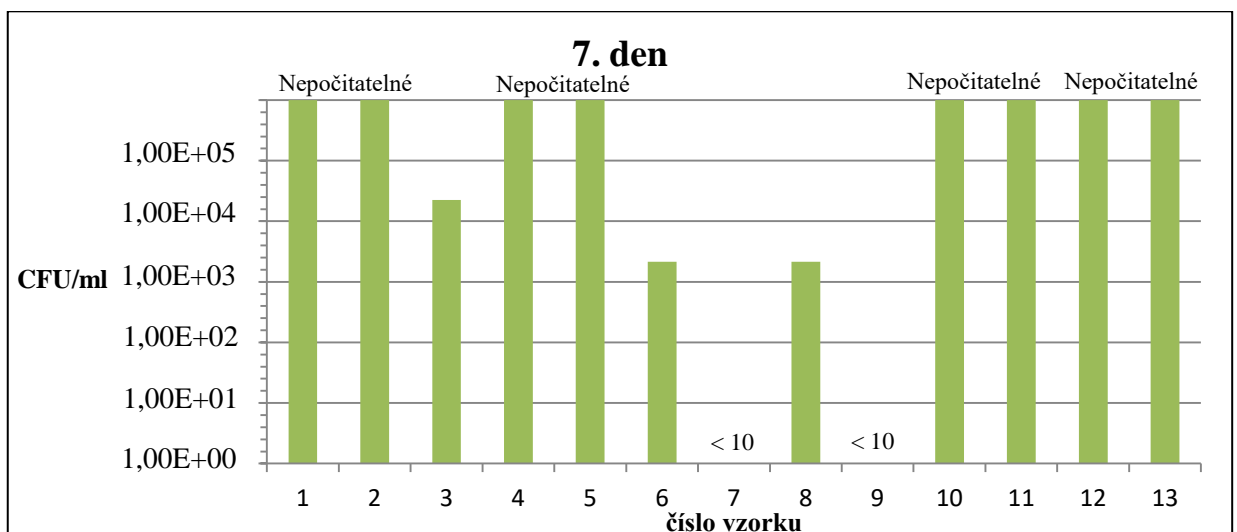
Graf 22: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 8 – 1. den



Graf 23: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 8 – 3. den



Graf 24: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 8 – 7. den



3.9 Působení antibiotik

Kančí sperma č. 9 zahrnovalo 10 vzorků s obsahem antibiotik, jak ukazuje tabulka 13. Vzorky byly testovány 3 po sobě následující dny.

1. den testování byl počet bakterií v nativním spermatu $2,2 \cdot 10^4$ CFU/ml. U vzorků 2, 3, 4, které obsahovaly ředidlo bez antibiotik, došlo k mírnému zvýšení počtu bakterií. Důvodem může být, že ředidlo podporuje růst bakterií nebo přidáním ředidla do vzorku mohlo dojít k zanesení kontaminace. U vzorků 5-10 s obsahem antibiotik nedošlo 1. den testování k významnému snížení počtu bakterií, i když snížení počtu přibližně o 1 řád bylo pozorováno (graf 25).

Počet bakterií v nativním vzorku se 2. den testování zvýšil na $9,1 \cdot 10^4$ CFU/ml. Ostatní vzorky nevykazovaly oproti 1. dni testování výraznou změnu v počtu bakterií, jak je vidět na grafu 26.

3. den testování byl nativní vzorek spermatu nepočítatelný. Významné snížení počtu bakterií na hodnotu < 10 CFU/ml bylo zaznamenáno u vzorků 7 a 10. Tyto vzorky obsahovaly vždy nejvyšší podíl ředidla s antibiotiky (graf 27).

Tabulka 14: Složení vzorků kančího spermatu č. 9

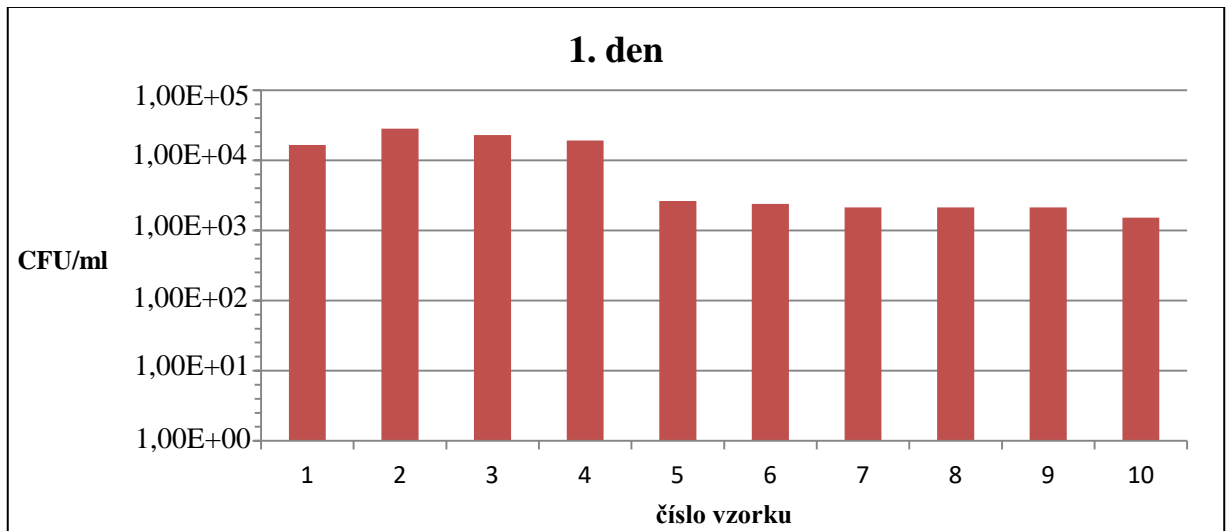
| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|--------------|------------------------------|----------------------|
| 1 | Nativní semeno | bez ředidla |
| 2 | Ředidlo bez antibiotik | 1:2 |
| 3 | Ředidlo bez antibiotik | 1:4 |
| 4 | Ředidlo bez antibiotik | 1:8 |
| 5 | Ředidlo s antibiotiky | 1:2 |
| 6 | Ředidlo s antibiotiky | 1:4 |
| 7 | Ředidlo s antibiotiky | 1:8 |
| 8 | Ředidlo s antibiotiky + 10 % | 1:2 |
| 9 | Ředidlo s antibiotiky + 10 % | 1:4 |
| 10 | Ředidlo s antibiotiky + 10 % | 1:8 |

Pozn.: Použité ředidlo = Tekutý koncentrát ředidla

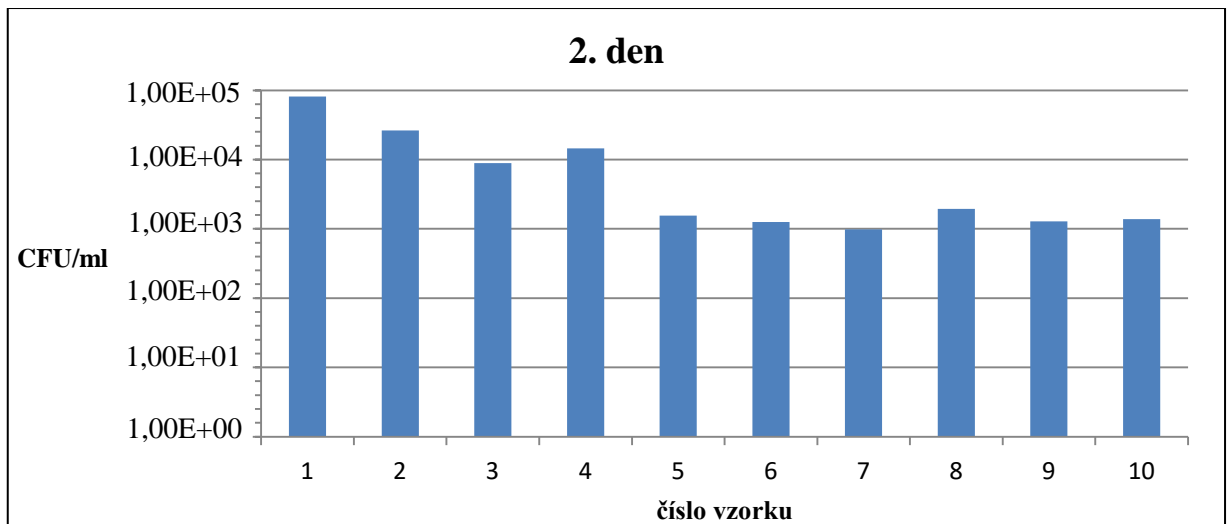
Antibiotika + 10 % = navážka antibiotik o 10 % více než je deklarované množství

Použitá antibiotika: směs antibiotik Euro-cocktail, Minitube, složení dle směrnice 90/429/EEC směs 500 µg streptomycinu, 500 MJ penicilinu, 150 µg linkomycinu a 300 µg spektinomycinu vše na 1 ml

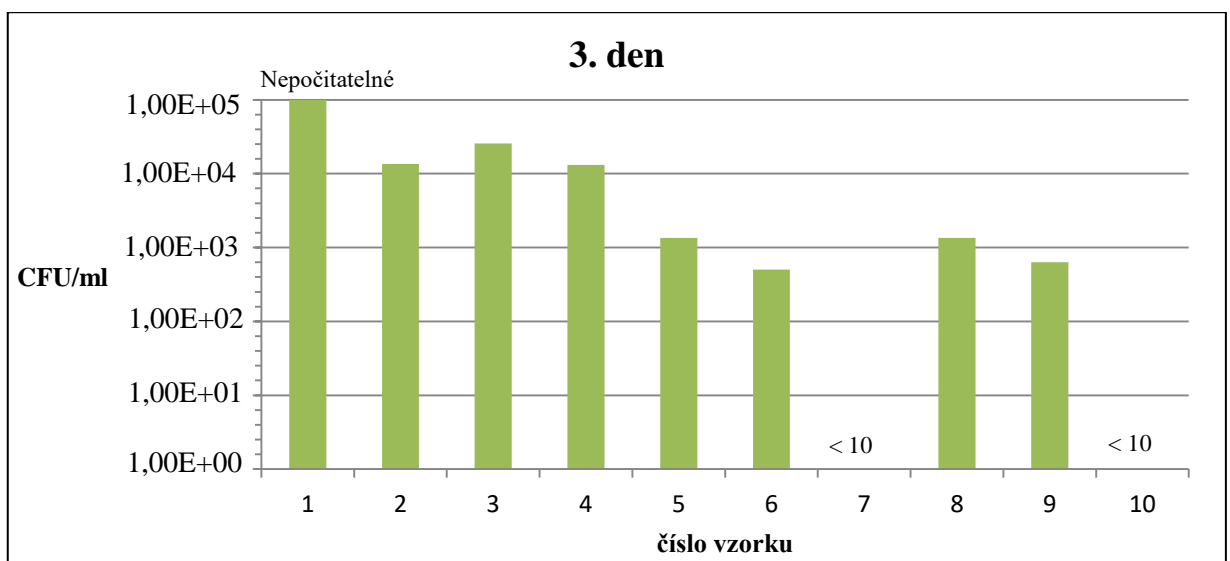
Graf 25: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 9 – 1. den



Graf 26: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 9 – 2. den



Graf 27: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 9 – 3. den



3.10 Působení ředidel BTS, koncentrát 1 a 2, VIP 3, BIO PIG, M III, OPTIM, SCP

Kančí sperma č. 10 zahrnovalo 10 vzorků s obsahem různých ředidel (tabulka 14). Vzorky byly testovány 1., 3. a 7. den skladování spermatu.

Nativní vzorek spermatu obsahoval 1. den testování $1,7 \cdot 10^5$ CFU/ml. U vzorků 3-9 s obsahem krátkodobých ředidel došlo k významné inhibici počtu bakterií, a to na hodnotu < 10 CFU/ml, jak ukazuje graf 28.

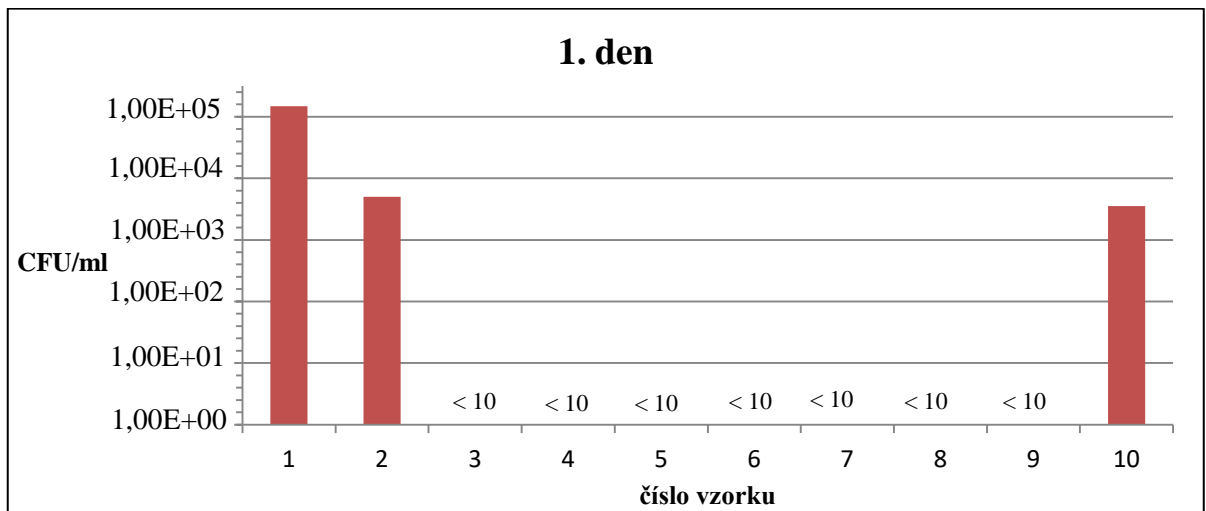
3. den byl nativní vzorek nepočítatelný. A vzorky 3-9 opět obsahovaly < 10 CFU/ml. U vzorku 2 došlo k mírnému nárůstu bakterií (graf 29).

Během 7. dne testování byly vzorky 1 a 2 nepočítatelné. Na grafu 30 je vidět, že u vzorků 3-10 byla hodnota počtu bakterií < 10 CFU/ml.

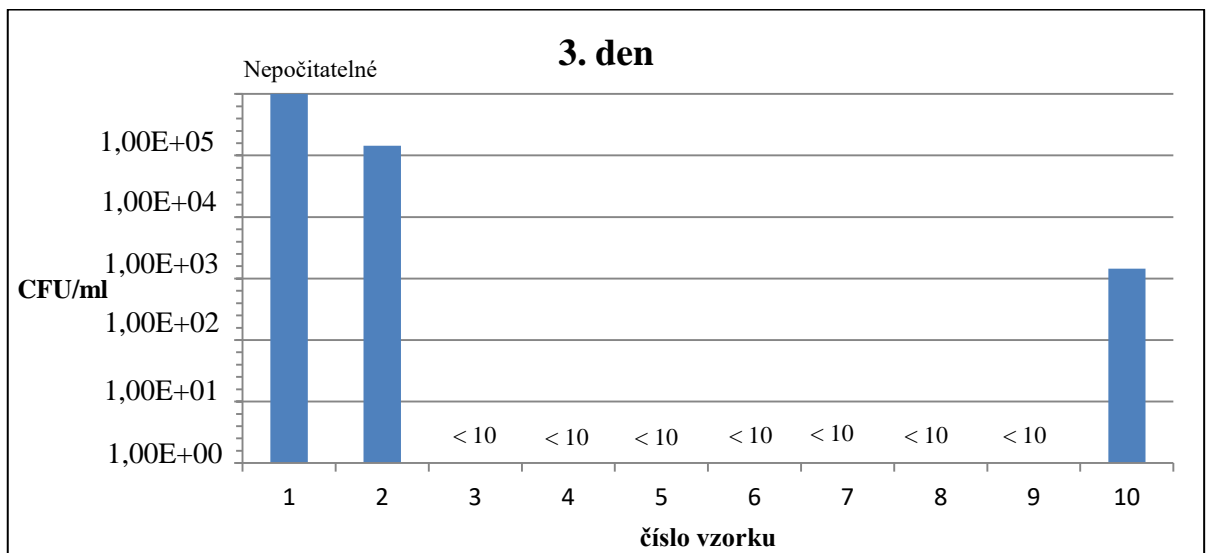
Tabulka 15: Složení vzorků kančího spermatu č. 10

| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|--------------|-----------------------------------|----------------------|
| 1 | Nativní semeno | bez ředidla |
| 2 | BTS bez antibiotik | 1:4 |
| 3 | BTS – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 4 | Koncentrát 1 – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 5 | Koncentrát 2 – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 6 | VIP 3 – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 7 | BIO PIG – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 8 | M III – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 9 | OPTIM – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 10 | SCP – dlouhodobé ředidlo | 1:4 |

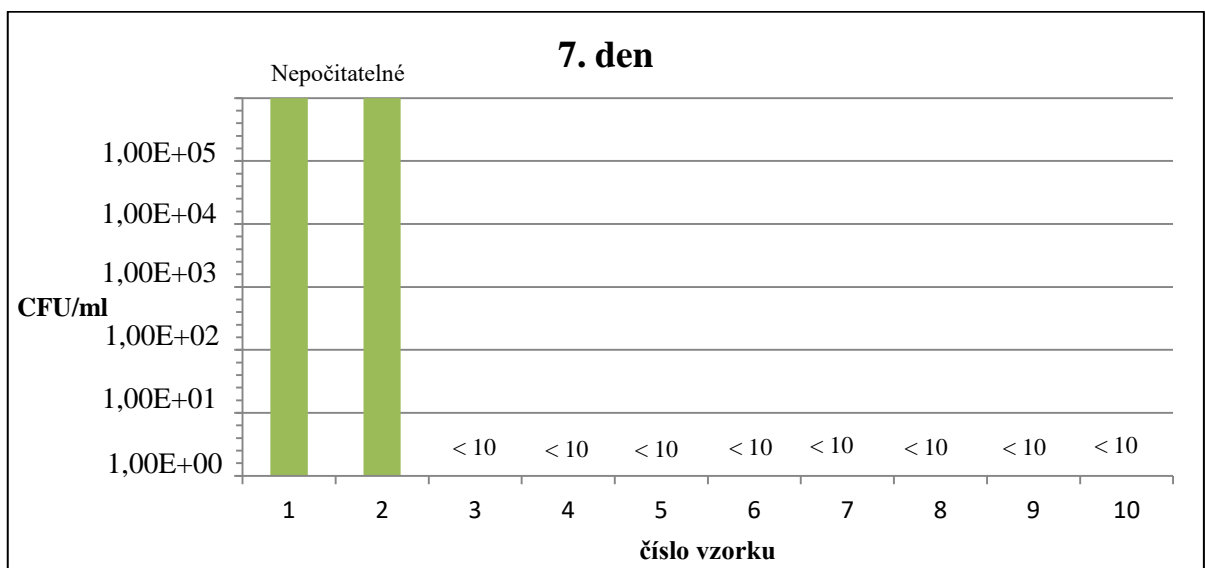
Graf 28: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 10 – 1. den



Graf 29: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 10 – 3. den



Graf 30: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 10 – 7. den



3.11 Působení ředidel BTS, koncentrát 1 a 2, VIP 3, BIO PIG, M III, OPTIM, SCP

Kančí sperma č. 11 bylo rozděleno na 10 vzorků s obsahem různých ředidel (tabulka 16). Vzorky byly testovány 1., 3. a 7. den skladování spermatu.

V nativním vzorku bylo 1. den testování $4,3 \cdot 10^5$ CFU/ml. Ke snížení počtu bakterií na hodnoty < 10 CFU/ml došlo u vzorků 6 (VIP 3), 7 (Bio PIG), 8 (M III) a 9 (OPTIM), jak ukazuje graf 31. Také u vzorků 3 (BTS) a 4 (koncentrát 1) bylo pozorováno snížení počtu bakterií, a to přibližně o 3 řády.

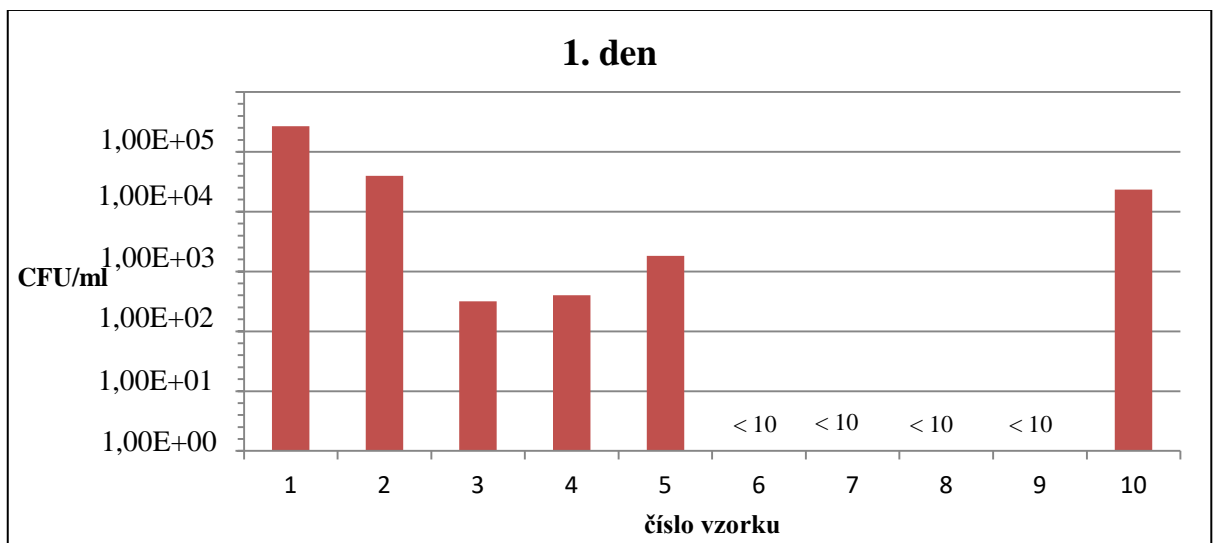
Počet bakterií se 3. den v nativním vzorku zvýšil na $8,5 \cdot 10^5$ CFU/ml. U vzorků 3-9 byly hodnoty CFU/ml < 10 . U vzorků 2 (BTS) a 10 (SCP) se počet bakterií výrazně nesnížil (graf 32).

7. den testování byl nativní vzorek spermatu nepočítatelný. Na grafu 33 je vidět, že u vzorků 2-9 byl počet bakterií < 10 . U vzorku 10 došlo ke kontaminaci a nebylo jej tedy možné hodnotit.

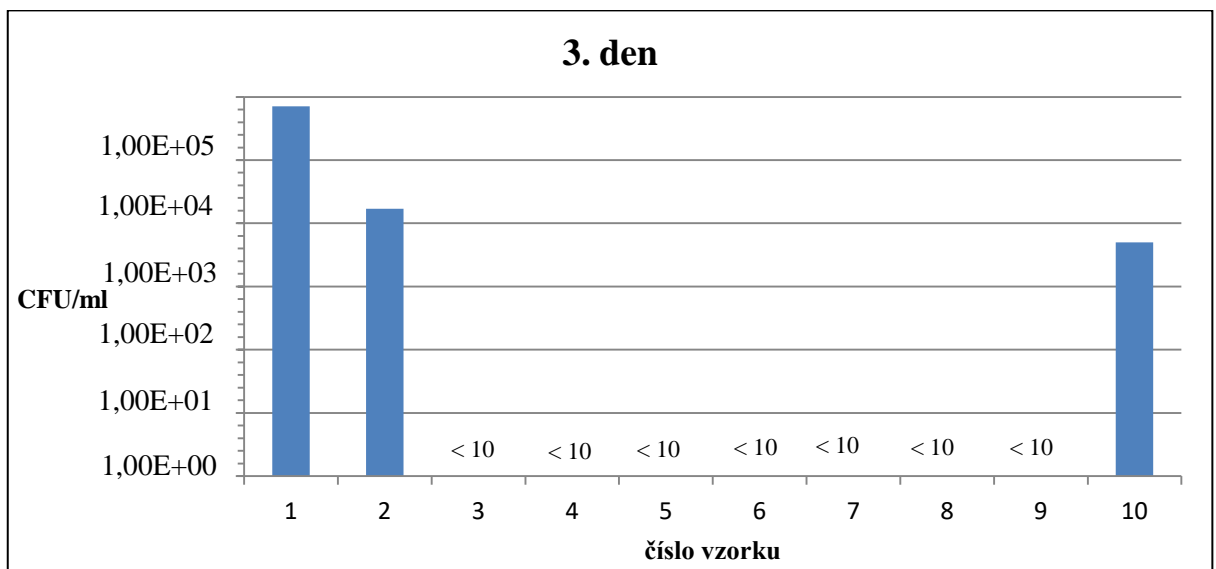
Tabulka 16: Složení vzorků kančího spermatu č. 11

| Číslo vzorku | Složení vzorku | Poměr sperma:ředidlo |
|--------------|-----------------------------------|----------------------|
| 1 | Nativní semeno | bez ředidla |
| 2 | BTS bez antibiotik | 1:4 |
| 3 | BTS – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 4 | Koncentrát 1 – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 5 | Koncentrát 2 – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 6 | VIP 3 – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 7 | BIO PIG – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 8 | M III – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 9 | OPTIM – krátkodobé ředidlo | 1:4 |
| 10 | SCP – dlouhodobé ředidlo | 1:4 |

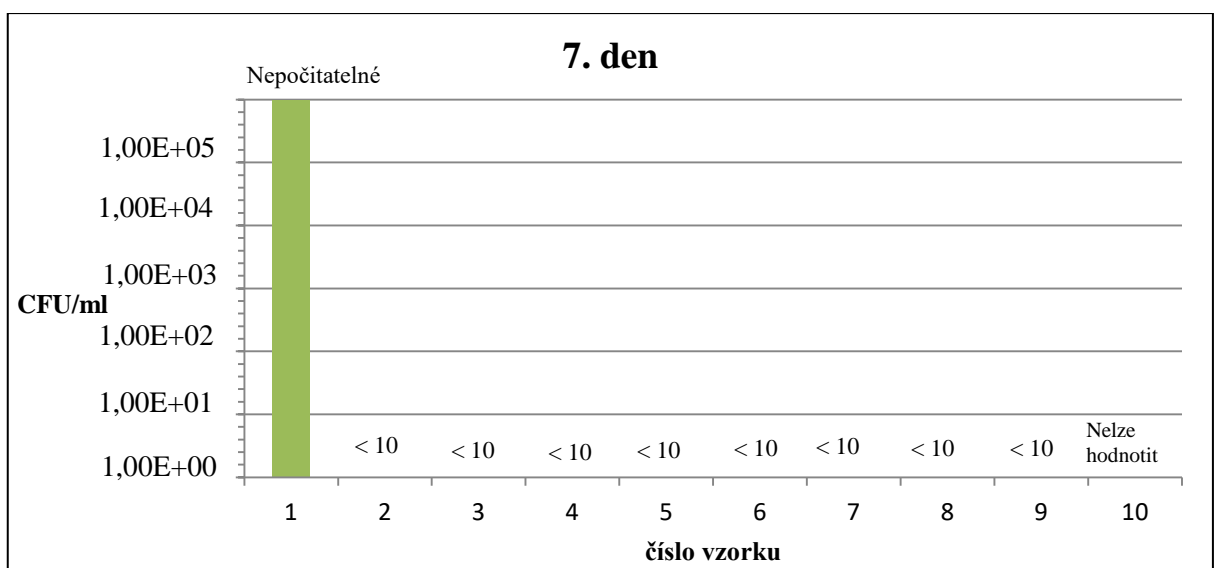
Graf 31: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 11 – 1. den



Graf 32: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 11 – 3. den



Graf 33: Stanovení celkového počtu bakterií (CFU/ml) ve vzorcích kančího spermatu č. 11 – 7. den



4. ZÁVĚR

Vyšetřeno bylo celkem 12 vzorků kančího spermatu od března roku 2016 do března roku 2017. Vzorky byly dodané Výzkumným ústavem živočišné výroby, v.v.i., oddělení chovu prasat, Kostelec nad Orlicí. Vzorky kančího spermatu byly transportovány a uchovávány při 17°C. Testována byla účinnost různých látek na inhibici mikroorganismů vyskytujících se v kančím spermatu.

Vzorky kančího spermatu byly očkovány na krevní agar metodou roztěru L-hokejkou. Očkováno bylo vždy 100 µl vzorku. Vzorky byly inkubovány při 37°C 48 hodin. Následně byly vzorky spermatu uchovávány při 17°C po dobu 3-7 dnů. Podle druhu testované ředící látky byly vzorky kančího spermatu opětovně zpracovány po 3 – 7 dnech uchovávání.

Výsledky experimentální části ukazují, že nejvíce účinné na inhibici mikroorganismů vyskytujících se v kančím spermatu byla komerční ředidla s obsahem antibiotik jako ředidlo BTS s obsahem antibiotik, Androhep, Vitasem LD, VIP 5, VIP 7, Koncentrát 1 a 2, BIO PIG, M III a OPTIM. Ostatní testované látky, ať přírodní (kyselina gallová, med) nebo chemické (thiosíran sodný, koloidní zinek) nevykazovaly významnou inhibici bakterií, tj. nedošlo ke snížení počtu bakterií minimálně o 4 řády.

V testovaných vzorcích kančího spermatu č. 5-8 byla pozorována rozdílná účinnost ředidel Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS. Vzorek kančího spermatu č. 6 obsahoval již v nativním vzorku malé množství bakteriálních buněk. Oproti tomu vzorek kančího spermatu č. 7 byl na množství bakteriálních buněk v nativním vzorku velmi bohatý. Od toho se odvíjelo rozdílné působení testovaných ředidel. U vzorku č. 6 došlo k významné inhibici již 1. den testování, oproti tomu u vzorku č. 7 nedošlo k významné inhibici ani 7. den testování. Ze stejného důvodu bylo rozdílné působení ředidel u vzorků č. 5 a 8. Působení ředidel Androhep, VIP 3, VIP 5, VIP 7, Vitasem LD a BTS se také odvíjelo od různého zastoupení mikroorganismů ve vzorcích spermatu.

Při testování krátkodobých ředidel BTS, koncentrát 1 a 2, VIP 3, BIO PIG, M III, OPTIM a dlouhodobého ředidla SCP bylo zjištěno, že účinek krátkodobých ředidel na bakteriální kontaminaci byl větší než účinek dlouhodobých ředidel.

Dále bylo prokázáno, že v nativním vzorku spermatu se během skladování měnilo složení mikroflóry. Ve většině případů byly vzorky 2. a 3. den testování (popř. 3. a 7. den) nepočítatelné a přerostlé druhem *Escherichia coli*, popř. *Proteus sp.*

V dalších studiích je nutné stanovení citlivosti mikroorganismů na antibiotika především u těch kmenů, které odolávaly působení ředidel. Experimentální část této práce se nezabývala účinkem testovaných látek na spermie. To je předmětem jiných studií.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITARATURY

1. AGARWAL, A., RAKESHK, S., DAVID R. NELSON, D. R. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. *Journal of Andrology*. 2003, 24(3), s. 343-352.
2. ALMOND, G., LEVIS, D., BRITT, J. ET AL. *The Swine AI Book: A Field and Laboratory Technicians' Guide to Artificial Insemination in Swine*. 2. Vyd. Morgan Morrow, 1998, 176 s. ISBN 0964073714, 9780964073715.
3. ALTHOUSE G. C., KUSTER C. E., CLARK S. G., WEISIGER R. M. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*. 2000, 53, s. 1167–76.
4. ALTHOUSE G. C., LU K. G. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*. 2005, 63, s. 573–584.
5. ALTHOUSE G. C. Sanitary Procedures for the Production of Extended Semen. *Reproduction in Domestic Animal*. 2008, 43 (2), s. 374–378.
6. AL-NAAMA R. T. Evaluation of *in-vitro* inhibitory effect of honey on some microbial isolate. *Journal of Bacteriology Research*. 2009, 1(6), s. 064-067.
7. ALVAREZ J. G., STOREY B. T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biology of Reproduction*. 1982, 27, s. 1102–1108.
8. ARDELEAN, V. *Fiziologia reproducerii animalelor*. Edit. Mirton, Timisoara. 2002, s. 344, ISBN 973-585-831-2.
9. ARMSTRONG S., OTIS G. W. The antibacterial properties of honey. *Bee Culture*. 1995, 123(9), s. 500-502.

10. AURICH, C., SPERGSE, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology* 67. 2007, s. 912–918.
11. BAŽANT, J. Inseminace prasat. *Státní plemenářské podniky, Praha*. 1988, 167 s.
12. BONG CH. W., MALFATTI F., AZAM F., OBAYASHI Y., SUZUKI S. The Effect of Zinc Exposure on the Bacteria Abundance and Proteolytic Activity in Seawater. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants, Terra Scientific Publishing Company, Tokyo*. 2010, s. 57-63.
13. BORGES A., FERREIRA C., SAAVEDRA M. J., SIMÕES M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial drug resistance*. 2013, 19(4), s. 256-265.
14. BORTOLOZZO F. P., WENTZ I. *Inseminação Artificial na Suinocultura Tecnificada. Suinocultura em ação*. Pallotti, Porto Alegre. 2005, 183 s.
15. BRUDZYNSKI K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology*. 2006, 52, s. 1228-37.
16. CASAS I. *A practical approach on boar sperm cryodamage. Morphofunctional and immunocytochemical study of cryopreserved boar sperm intended for use in artificial insemination*. University of Girona, Spain. 2010. Doctoral thesis.
17. CENTURION F., VAZQUEZ J. M., CAVELTE J. J., ROC, J., SANZ L., PARRILLA. I., GARCIA. E. M., MARTINEZ, E. A. Influence of Porcine Spermadhesins on the Susceptibility of Boar Spermatozoa to High Dilution. *Biology of reproduction*. 2003, 69, s. 640–646.
18. CEROLINI S., MALDJIAN A., SURAI P., NOBLE R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 2000, 58, s. 99–111.

19. CEROLINI S., MALDJIAN A., PIZZI F., GLIOZZI T. M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 2001, 121, s. 395–401.
20. COWAN, M. M. Plant products as Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews*. 1999, 12, s. 564-584.
21. CUSHNIE T. P. T., LAMB A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005, 26, s. 343–356.
22. ČEŘOVSKÝ J. Základní fyziologické a technologické předpoklady reprodukce prasat, s. 15–41. In: Říha J. *Reprodukce v procesu šlechtění prasat*. ACHMP, Rapotín. 2001, 135 s, ISBN 80-903143-3-3.
23. ČEŘOVSKÝ J. Inseminace prasat, s. 106–134. In: Louda F. *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. ČZU, Praha. 2001, 225 s., ISBN 80-213-0702-1.
24. DÍAZ-GÓMEZ R., TOLEDO-ARAYA H., LÓPEZ-SOLÍS R., OBREQUE-SLIER E. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. *Food science and technology*. 2014, 59, s. 896-900.
25. DOROTSKAR K., SHOUSHTARI S. M. A., KHAKI A. Effects of In Vitro Zinc Sulphate Additive to The Semen Extender on Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa before and after Freezing. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2014, 8(3), s. 325-332.
26. DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, 88, s. 308-316.
27. EDDY E. M. The spermatozoon, s. 3–54. In: Neill J. (ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3. Vyd. Elsevier, San Diego. 2006, 3230 s., ISBN 978-0-12-515400-0.
28. ESTIENNE M. J., HARPER A. F. Semen characteristics and libido in boars treated repeatedly with PGF_{2α}. *Animal Reproduction Science*. 2004, 82, s. 1494-1498.

29. FÀBREGA A. *A molecular approach on sperm ganges during epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation of boar spermatozoa*. University of Girona, Spain. 2012. Doctoral thesis.
30. FAIZ U., BUTT T., SATTI L., HUSSAIN W., HANIF F. Efficacy of zinc as an antibacterial agent against enteric bacterial pathogens. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad*. 2011, 23(2), s. 18-21.
31. FAUSTINO C., PINHEIRO L. Antimicrobial properties and therapeutic benefits of honey in the quest for more efficient antimicrobial agents, *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, 2015, s. 98 - 108.
32. FRASER L., GORSZCZARUK K., STRZEZEK J. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reproduction in Domestic Animals*. 2001, 36, s. 325-329.
33. FRUNZA I., CERNESCU H., KORODI G. Physical and chemical parameters of boar sperm. *Lucrări Stiințifice Medicină Veterinară*. Timisoara, Romania. 2008, 41, s. 634-640.
34. GAÇZARZEWICZ D., UDAŁA J., PIASECKA M., BŁASZCZYK B., STANKIEWICZ T. Bacterial contamination of boar semen and its relationship to sperm quality preserved in commercial extender containing gentamicin sulfate. *Polish Journal of Veterinary Science*. 2016, 19(3), s. 451-459.
35. GADEA J. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2003, 1(2), s. 17-27.
36. GAMČÍK P., KOZUMPLÍK J., SCHWARC F., VLČEK Z., ZIBRÍN M. *Umelá inseminácia a andrologia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava. 1976, 574 s., ISBN 64-025-76.

37. HOLT W. V., HARRISON R. A. P. Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase a-dependent pathway: Between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase a activation. *Journal of Andrology*. 2002, 23, s. 235-243.
38. CHEMINADE C., GAUTIER V., HICHAMI A., ALLAUME P., LE LANNOU D., LEGRAND A. B. 1-O-ALKYLGLYCEROLS improve boar sperm motility and fertility. *Biology of Reproduction*. 2002, 66, s. 421-428.
39. JOHNSON L. A., AALBERS J. G., GROOTEN H. J. G. Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville TS BTS., Modified Modena _MM., or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthygiene*. 1988, 23, s. 49–55.
40. JOHNSON L. A., WEITZE K. F., FISER P., MAXWELL W. M. C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 2000, 62, s. 143 –172.
41. KAČÁNIOVÁ M., VUKOVIC N., BOBKOVÁ A., FIKSELOVÁ M., ROVNÁ K., HAŠČÍK P., ČUBOŇ J., HLEBA L., BOBKO M. Antimicrobial and antiradical activity of Slovakian Honeydew honey samples. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2011, 1(3), s. 354-36.
42. KALEMBA D., KUNICKÁ A. Antibacterial and antifungal properties of Essentials oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, 10, s. 813-829.
43. KAUR T., GUPTE S., KAUR M. Effect of zinc on antibiotic susceptibility in standard *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open access*. 2015, 1(2), s. 00008.
44. KELLY J., HAEGGBLOM M., TATE R. L. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. *Biology and Fertility of Soils*. 2003, 38(2), s. 65–71.
45. KLIMENT J., HINTNAUS J., NOVÁK M., ROB O., ŠŤASTNÝ P. *Reprodukcia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava. 1989, 392 s., ISBN 80-07-00027-5.

46. KOMMISRUDE E., PAULENZ H., SEHESTED E., GREVLE I.S. Influence of boar and semen parameters on acrosome integrity in liquid stored for five days. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2002, 43, s. 49-51.
47. KOPŘIVA J., PÁCOVÁ J., PRÁŠIL L. *Inseminace prasat v praxi*, Plemenář Brno, a.s., 1996, s. 48.
48. KUDLÁČ E. Rozmnožování (Reprodukce), s. 301–330. In: Jelínek P., Koudela K. *Fyziologie hospodářských zvířat*. MZLU, Brno. 2003, 414 s., ISBN 80-7157-644-1.
49. KUSTER C. E., ALTHOUSE G. C.: The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology* 85. 2016, s. 21–26.
50. KWAKMAN P. H. S., TE VELDE A. A., DE BOER L., SPEIJER D., VANDENBROUCKE-GRAULS CH. M. J. E., ZAAT S. S. J. How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*. 2010, 24, s. 2576-2582.
51. KWAKMAN P. H. S., ZAAT S. A. J. Antibacterial components of honey. *Life*. 2012, 64(1), s. 48-55.
52. LEIN D. H. *The current role of ureaplasma, mycoplasma, haemophilus somnus in bovine reproductive disorders*. Paper presented at: Proceedings of the 11th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination; Wisconsin 1986.
53. MAES D., NAUWYNCK H., RIJSSELAERE T., MATEUSEN B., VYT P., DE KRUIF A., VAN SOOM A. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology* 70. 2008, s. 1337–1345.
54. MAHENDRAN S., KUMARASAMY D. Antimicrobial activity of some honey samples against pathogenic bacteria. *International Letters of Natural Science*. 2015, 34, s. 15-20.
55. MARINO, M., BERSANI, C., COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, 67, s. 187-195.

56. MARTÍN L. O. M., MUÑOZ E. C., DE CUPERE F., VAN DRIESSCHE E., ECHEMENDIA-BLANCO D., J. M. M., BEECKMANS S. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*. 2010, 120, s. 95–104.
57. MAZUROVÁ J., LYSKOVÁ P., HRDINOVÁ M. AND ŠOŠOVIČKOVÁ P. Effects of natural substances on microorganisms isolated from raw boar ejaculates. *Reproduction in Domestic Animals*. 2006, 41, s. 321.
58. MAZUROVÁ J., KUKLA R., ROZKOT M., LUSTYKOVÁ A., SLEHOVÁ E., SLEHA R., LIPENSKÝ J., OPLETAL L. Use of natural substances for boar semen decontamination. *Veterinární Medicína*. 2015, 60(5), s. 235–247.
59. MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA M., WYSOCKI P., STRZEŻEK J., KORDAN W. Zinc binding proteins from boar seminal plasma — isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4 °C. *Acta Biochimica Polonica*. 2011, 58, s. 171-177.
60. MOHAPATRA D. P., THAKUR V., BRAR S. K. Antibacterial efficacy of raw and processed honey. *Biotechnology Research International*. Volume 2011, s. 1-6.
61. MORELL J. M., WALLGREN, M. Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science*. 2011, 123, s. 64–69.
62. MORELL J. M., WALLGREN, M. Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review. *Pathogens*. 2014, 3, s. 934-946.
63. MORRELL J. M., RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Colloid Centrifugation of Semen: Applications in Assisted Reproduction. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2016, 7, s. 597-610.
43. PAULENZ H., KOMMISRUDE E., HOFMO P. O. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 2000, 35, s. 83-85.

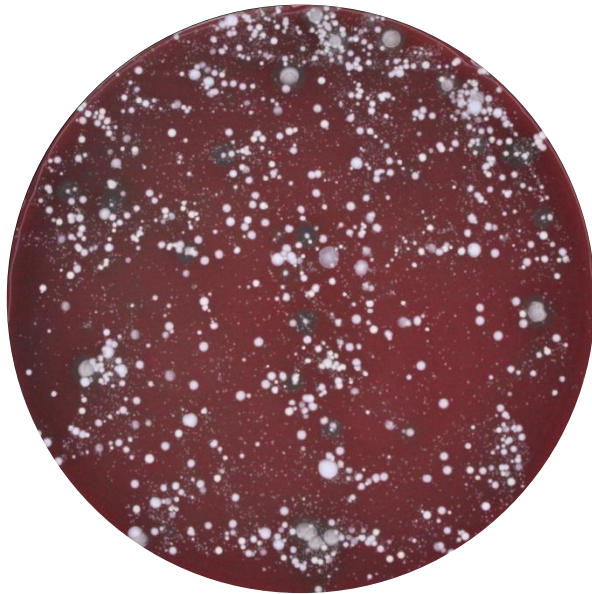
44. ROZEBOOM K. J. Evaluating boar semen quality. *Animal Science Facts*. 2000, s. 7.
45. ŘÍHA J., PETELÍKOVÁ J., ČEŘOVSKÝ J., BAŽANT J., BOCHENEK M., PYTLOUN J. *Plemenitba hospodářských zvířat*. VÚCHS, Rapotín. 2003, 151 s., ISBN 80-903143-41.
46. SANCHO S., VILAGRAN I. *The boar ejaculate: sperm function and seminal plasma analyses*. In *Boar reproduction, Fundamentals and New biotechnological Trends* (ed. by Bonet S., Casas I., Holt W. V., Yeste M.). Springer – Verlag, Heidelberg, Berlin. 2013, s. 471 – 516.
47. SEILER C., BERENDONK T. U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology, Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*. 2012, 3, s. 1-10.
48. SHIN S. J. *The control of mycoplasmas, ureaplasmas, campylobacter fetus, haemophilus somnus in frozen bovine semen*. Paper presented at: Proceedings of the 11th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination; Wisconsin 1986.
49. SEPÚLVEDA L., EVA BUSSALLEU E., MARC YESTE M., BONET S.: Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2014, 150, s. 96–106
50. SCHULZE M., JUNKES C., MUELLER P., SPECK S., RUEDIGER K., DATHEZ M., MUELLER K. Effects of Cationic Antimicrobial Peptides on Liquid-Preserved Boar Spermatozoa. *Plos One*. 2014, 9(6), s. e100490.
51. SÖDEBERG T. A., SUNZE B., HOLM S., ELMRO T., HALLMANS G., SJÖBERG S. Antibacterial effect of zinc oxide in vitro. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*. 1990, 24, s. 193-197.
52. STOJANOVIC G., RADULOVIC N., HASHIMOTO T., PALIC R. In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, 101, s. 185-190.

53. STRZEŹEK J., KORDA W., GLOGOWSKI J., WYSOCKI P., BORKOWSKI K. Influence of Semen-collection Frequency on Sperm Quality in Boars, with Special Reference to Biochemical Markers. *Reproduction in Domestic Animals*. 1995, 30(2), s. 85-94
54. STRZEŹEK J., WYSOCKI P., KORDAN W., KUKLINSKA M. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reproductive Biology*. 2005, 5, s. 279–290.
55. TROMBETTA, D., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G., VENUTI, V., CRISTANI, M., DANIELE, C., SAIJA, A., MAZZANTI, G., BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005, 49, s. 2474-2478.
56. TURBA M. E., FANTINATI P., BERNADINI C., GENTILINI F., BACCI M. L., FORNIM. Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. *Animal Reproduction Science*. 2007, 99, s. 72-81.
57. ÚBEDA J. L., AUSEJO R., DAHMANI Y., FALCETOM. V., USAN A., CLARA MALO C., PEREZ-MARTINEZ F. P.: Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology* 80. 2013, s. 565–570.
58. VĚŽNÍK Z., ŠVECOVÁ D., ZAJÍCOVÁ A., PŘINOSILOVÁ P. *Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. VÚVeL, Brno. 2004, 197 s.
59. WATSON P. F. Artificial Insemination and Preservation of Semen. *In Marshall's Physiology of Reproduction*. 1990, 2, s. 748-869.
60. Watson P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals*. 1995, 31, s. 135-140.
61. YANÍZ J. L., MARCO-AGUADO M. A., MATEOS J. A., SANTOLARIA P. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Animal Reproduction Science*, 2010, 122(1-2), s. 142-149.

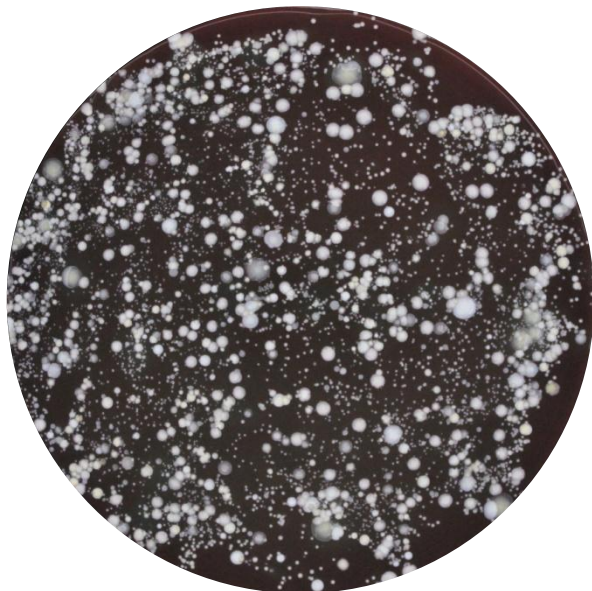
62. YESTE M. *New insights into boar sperm function and survival from integrated field and laboratory studies*. University of Girona, Spain. 2008. Doctoral thesis.

6. PŘÍLOHY

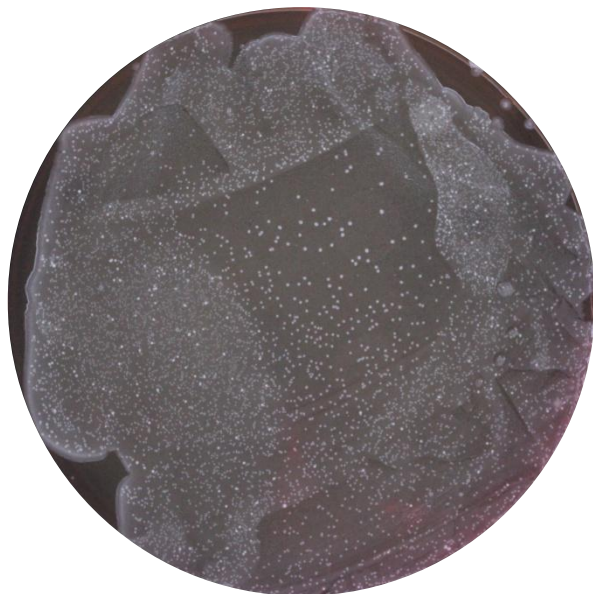
Příloha A1: Nárůst bakterií v nativním vzorku kančího spermatu č. 3 (1. den)



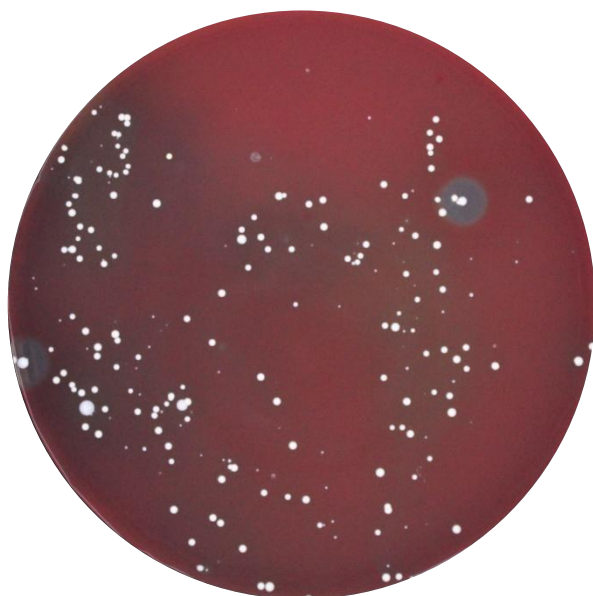
Příloha A2: Nárůst bakterií v nativním vzorku kančího spermatu č. 3 (2. den)



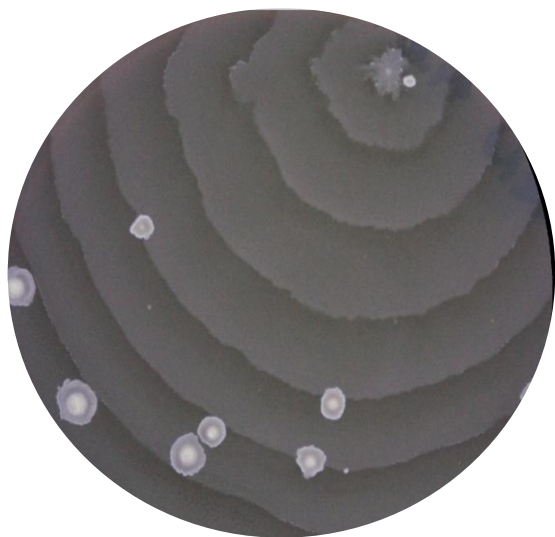
Příloha A3: Nárůst bakterií v nativním vzorku kančího spermatu č. 3 (3. den)



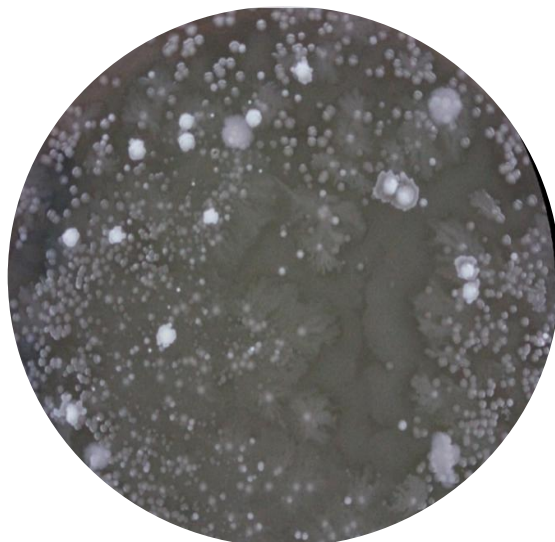
Příloha A4: Nárůst bakterií ve vzorku 16 kančího spermatu č. 3 s nejvyšší koncentrací kyseliny gallové (3. den)



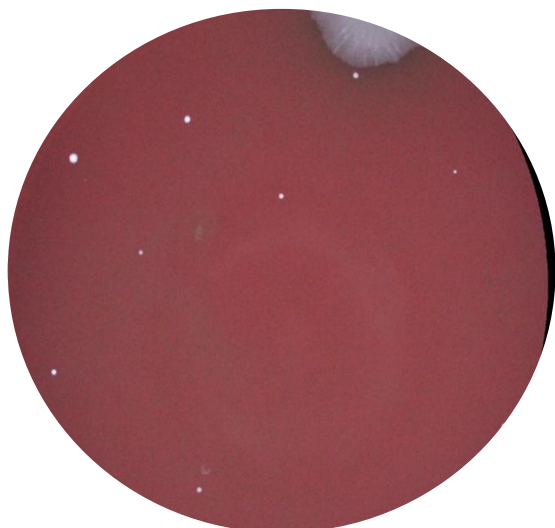
Příloha B1: Nárůst bakterií ve vzorku 3 (ředidlo Androhep) kančího spermatu č. 8 (3. den)



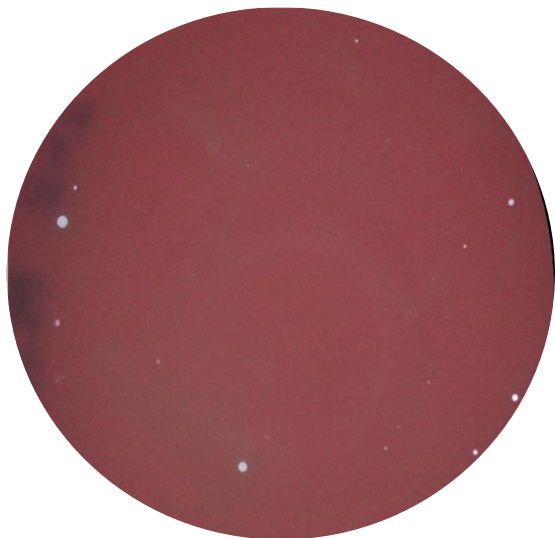
Příloha B2: Nárůst bakterií ve vzorku 5 (ředidlo VIP 3) kančího spermatu č. 8 (3. den)



Příloha B3: Nárůst bakterií ve vzorku 7 (ředidlo VIP 5) kančího spermatu č. 8 (3. den)



Příloha B4: Nárůst bakterií ve vzorku 9 (ředidlo VIP 7) kančího spermatu č. 8 (3. den)



Příloha B5: Inhibice bakterií ve vzorku 11 (ředidlo Vitasem LD) kančího spermatu č. 8 (3. den)

