

ZASTOSOWANIE LIZOZYMU I NIZYNY JAKO SUBSTANCJI BAKTERIOSTATYCZNYCH W KONSERWACJI NASIENIA PSÓW – BADANIA WSTĘPNE

Oksana Pulkowska-Bluj¹, Monika Trzcińska¹, Paweł Stefanowicz²

¹Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji, 32-083 Balice k. Krakowa

²Prywatna praktyka weterynaryjna: Przychodnia Weterynaryjna RETINA, ul. A. Szyllinga 3, 31-444 Kraków

E-mail: oksana.pulkowska@iz.edu.pl



Oksana Pulkowska-Bluj: <https://orcid.org/0009-0002-3149-1976>

Monika Trzcińska: <https://orcid.org/0000-0001-9758-1304>

Źródło finansowania: zadanie statutowe 501-191-321.

Abstrakt

Celem przeprowadzonych badań była ocena efektywności działania bakteriostatycznego nizyny (Niz) i lizozymu (Liz) oraz ich wpływu na jakość nasienia psów przechowywanego krótkoterminowo. Pobrane ejakulatory rozcieńczono w rozcieńczalniku Tris-cytrynianowo-fruktozowym z dodatkiem żółtka jaja kurzego (TCF-EY). Do TCF-EY dodano antybiotyki (benzylpenicylina 0,06 g/100 ml + streptomycyna 0,1 g/100 ml), otrzymując grupę kontrolną: Antb oraz bakteriostatyki otrzymując dwie grupy eksperymentalne: Niz (nizyna 50 µg/ml + EDTA 1,25 µg/ml) oraz Liz (lizozym 500 µg/ml). Nasienie przechowywano w temp. 4°C, a po 48 i 96 godzinach przeprowadzono analizy parametrów: ruchliwości, morfologii, integralności błon komórkowych oraz struktury chromatyny. Wykonano również posiew i antybiogram dla próbek każdego z ejakulatów. Dodatki nizyny i lizozymu wykazały działanie bakteriostatyczne porównywalne do standardowo stosowanych antybiotyków. Wyhodowane bakterie z rodziny Enterobacteriaceae wykazały oporność na amoksycylinę z kwasem klawulanowym. Pod względem jakościowym dodatki Niz i Liz nie wpłynęły istotnie na takie parametry jak: ruchliwość, morfologia, integralność błony komórkowej oraz struktura chromatyny plemników po 48 i 96 godzinach przechowywania. Uzyskane wyniki sugerują, że nizyna i lizozym mogą stanowić skuteczną alternatywę dla klasycznych antybiotyków w krótkoterminowym przechowywaniu nasienia psów.

Słowa kluczowe: nasienie psa, chłodzenie, nizyna, lizozym, konserwacja nasienia psa, bakteriostatyki

Wstęp

Chłodzenie nasienia jest jedną z najczęściej stosowanych i skutecznych metod umożliwiających zachowanie potencjału zapładniającego plemników w warunkach krótkoterminowego przechowywania. W celu utrzymania odpowiednich parametrów jakościowych plemników, nasienie rozrzedza się w odpowiednich rozcieńczalnikach, które oprócz składników osłaniają-

cych, stabilizujących i energetycznych zawierają również antybiotyki, mające na celu ograniczenie namnażania się bakterii w czasie przechowywania nasienia (Schäfer-Somi i in., 2022). Bakteriospermia u psów jest zjawiskiem powszechnym, obserwowanym w ponad 80% badanych ejakulatów, w tym również u osobników klinicznie zdrowych (Agudelo-Yepes i in., 2023). Główne źródła zanieczyszczenia mikrobiologicznego nasienia stanowi środowisko zewnętrzne oraz mikroflora cewki moczowej. Zanieczyszczenia mogą być dodatkowo potęgowane przez niewystarczającą higienę podczas procedury pobierania ejakulatu, co jednoznacznie podkreśla znaczenie zachowania odpowiednich standardów w procesie pobierania nasienia (Agudelo-Yepes i in., 2023). Stosowanie antybiotyków w rozcieńczalnikach nasienia ma na celu zapewnienie bezpieczeństwa mikrobiologicznego przechowywanego materiału biologicznego przeznaczonego do inseminacji, który często stanowi również przedmiot międzynarodowego handlu (Peña i in., 2006). Mechanizm działania antybiotyków stosowanych w konserwacji nasienia opiera się głównie na bakteriolizie, wynikającej z zakłócenia syntezy ściany komórkowej bakterii. Proces ten prowadzi do rozpadu bakterii i uwolnienia endotoksyn, w tym lipopolisacharydów, które mogą jednak negatywnie wpływać na parametry jakościowe plemników (Santos i Silva, 2020; Ros-Santaella i in., 2024). Ponadto dodatek antybiotyków do nasienia może prowadzić do zaburzeń mikrobiomu żeńskiego układu rozrodczego, który odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu miejscowej ochrony przed infekcjami (Agudelo-Yepes i in., 2023).

Istotnym wyzwaniem dla medycyny weterynaryjnej pozostaje narastająca oporność bakterii na działanie antybiotyków. Zjawisko to może być potęgowane również przez nadmierne stosowanie antybiotyków w konserwacji nasienia. W związku z tym, aktualne badania koncentrują się na ocenie wpływu probiotyków oraz naturalnych substancji przeciwdrobnoustrojowych, w tym substancji antybakteryjnych (AMPPs, ang. Antimicrobial Peptides and Proteins), na jakość nasienia oraz ich potencjalne zastosowanie w konserwacji nasienia zwierząt gospodarskich i towarzyszących (Miao i in., 2024; Ros-Santaella i in., 2024).

AMPPs to grupa cząsteczek zdolnych do immunostymulacji, stanowiących pierwszą linię obrony w zwalczaniu patogenów: zarówno bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych oraz niektórych wirusów. W ostatnich latach poznano mechanizmy działania szeregu substancji naturalnie występujących w nasieniu ssaków takich jak: lizozym, laktoferyna, fosfolipaza A2 (PLA2), czy inhibitor proteaz leukocytarnych (SLPI). Substancje te wykazują działanie bakteriostatyczne oraz mają pozytywny wpływ na jakość nasienia (Miao i in., 2024). Lizozym (inaczej muramidaza) to pierwszy odkryty enzym o działaniu antybakteryjnym. Występuje w płynach ustrojowych, takich jak łzy, mleko, nasienie i ślina, a także w różnych tkankach i komórkach organizmu. Stanowi element wrodzonej odporności ssaków przeciwko patogenom (Miao i in., 2024; Ros-Santaella i in., 2025). Nizyna jest polipeptydem syntetyzowanym przez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a jej działanie bakteriostatyczne wykorzystywane jest od lat 50. XX wieku w konserwacji produktów spożywczych – głównie przetworów mięsnych i nabiału. Bakteriocyna ta stanowi również przedmiot badań biomedycznych dotyczących terapii nowotworów oraz infekcji bakteryjnych (Ros-Santaella i in., 2024). W doświadczeniu dotyczącym nasienia knurów wykazano, że oba te peptydy znacząco redukują liczbę bakterii, nie wpływając negatywnie na jakość plemników podczas 48-godzinnego przechowywania w temperaturze 17°C (Ros-Santaella i in., 2024).

Powyższe wyniki badań skłoniły autorów prezentowanej pracy do zbadania przydatności wybranych AMPPs w krótkoterminowym przechowywaniu nasienia psów. Głównym celem badań była ocena działania bakteriostatycznego nizyny i lizozymu oraz ich wpływu na parametry jakościowe plemników podczas przechowywania nasienia psów w temperaturze 4°C przez 48 i 96 godzin.

Material i metody

Pobranie i konserwacja nasienia

Doświadczenie przeprowadzono na trzech ejakulatach, pobranych od trzech psów – reproduktorów różnych ras: (pies nr 1 – łajka jakucka, wiek 6 lat; pies nr 2 – chart polski, wiek 2 lata; pies nr 3 – border collie, wiek 2 lata). Wszystkie psy pochodziły z hodowli prywatnych i były zarejestrowane w Polskim Związku Kynologicznym. Zwierzęta żywiono pełnoporcjową, zbilansowaną karmą komercyjną (suchą) i nie otrzymywały doustnych ani miejscowych antybiotyków przez co najmniej 30 dni poprzedzających pobranie nasienia. Kryterium kwalifikacyjnym do badań była płodność samców, udokumentowana na podstawie wcześniejszych skutecznych kryć lub inseminacji zakończonych wielopłodową ciążą.

Przed pobraniem nasienia okolicę prącia dokładnie oczyszczono roztworem chlorheksydyny, a następnie napletek przepłukiwano sterylnym roztworem soli fizjologicznej, celem minimalizacji ryzyka kontaminacji mikrobiologicznej. Stymulację wężową samców przeprowadzano przy użyciu wymazów z pochwy suk w fazie rui, co pozwalało na uzyskanie fizjologicznej reakcji erekcyjnej. Ejakulaty pobierano wykonując około jednodominutowy masaż opuszki prącia (*bulbus glandis*), stosując jałowe rękawiczki jednorazowe. Plemnikiemową frakcję ejakulatu, pobierano bezpośrednio do sterylnej probówki połączonej ze sterylizowanym lejką, zapewniając aseptyczne warunki podczas całej procedury. Do badań kwalifikowano ejakulaty spełniające następujące kryteria jakościowe: całkowita ruchliwość plemników $\geq 90\%$, koncentracja plemników $\geq 200 \times 10^6/\text{ml}$, prawidłowa morfologia plemników $\geq 70\%$. Ejakulaty wirowano ($720 \times \text{g}$, 4 min), a następnie plemniki rozrzedzano w rozcieńczalniku Tris-cytrynianowo-fruktozowym z dodatkiem żółtka jaja kurzego (TCF-EY) o następującym składzie: 3,025 g TRIS; 1,7 g kwas cytrynowy; 1,25 g fruktoza; 20% żółtko jaja kurzego (Peña i in., 2006). Każdy rozcieńczony w ten sposób ejakulat dzielono na trzy grupy:

1. Kontrola (Antb): TCF-EY z dodatkiem standardowo stosowanych antybiotyków — benzylopenicyliny (0,06 g/100 ml) i streptomycyny (0,1 g/100 ml),
2. Liz: TCF-EY z dodatkiem lizozymu (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$),
3. Niz: TCF-EY z dodatkiem nizyny (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oraz EDTA (1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Dodatek EDTA w grupie Niz miał na celu zwiększenie skuteczności działania bakteriostatycznego w odniesieniu do bakterii Gram-ujemnych (Ros-Santaella i in., 2024). Po przygotowaniu, próbki umieszczano w chłodni i przechowywano w temperaturze 4°C przez 96 godzin.

Metody oceny jakości nasienia

Analizę nasienia przeprowadzano bezpośrednio po pobraniu (0 h) oraz po 48 i 96 godzinach przechowywania w temperaturze 4 °C. Ruchliwość plemników oraz ich koncentrację oceniano z wykorzystaniem systemu CASA (Computer Assisted Semen Analysis, S.C.A. V5.1, Microptic, Barcelona, Spain). Określono odsetek wszystkich plemników wykazujących ruch (parametr ruchu całkowitego – RC) oraz odsetek plemników o ruchu prawidłowym – postępowym (parametr ruchu postępowego – RP). Ocenę budowy morfologicznej plemników wykonywano na co najmniej 200 plemnikach z każdej badanej próbki. Analizy przeprowadzono w mikroskopie świetlnym (Nikon Eclipse 200, Tokyo, Japonia) przy powiększeniu 100×, pod imersją. Do wykonania preparatów zastosowano rozmaz manualny, barwiony następnie metodą Diff-Quick® (RAL Diagnostics, Martillac, Francja). Ocenę przeprowadzono zgodnie z klasyfikacją morfologiczną wad plemników według kryteriów zaproponowanych przez Brito i in. (2025).

Ocenę integralności błon komórkowych oraz struktury chromatyny plemników przeprowadzono w cytometrze przepływowym (CytoFLEX, Beckman Coulter, USA) zgodnie z metodyką opisaną przez Gogola i Trzcińską (2020). Integralność błon komórkowych anali-

zowano przy użyciu zestawu Live/Dead Sperm Viability Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Strukturę chromatyny plemnikowej oceniano z zastosowaniem metody Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), pozwalającej na detekcję nieprawidłowości w kondensacji i stabilności chromatyny plemnikowej.

Badanie bakteriologiczne

Próbki nasienia natywnego oraz przechowywanego przez 48 i 96 h pobierano za pomocą wymazówek z podłożem węglowym i przesyłano do laboratorium komercyjnego (Vetlab, Polska). Próbki posiano na następujących podłożach mikrobiologicznych: agar Columbia z 5% krwią owczą, agar MacConkeya, agar Columbia CNA z 5% krwią owczą oraz agar czekoladowy. Inkubację przeprowadzono w temperaturze 35–37 °C przez 48 godzin w atmosferze tlenowej (dla agaru Columbia z 5% krwią owczą, agaru MacConkeya oraz agaru Columbia CNA z 5% krwią owczą) lub w atmosferze podwyższonego stężenia CO₂ (dla agaru czekoladowego), przy użyciu generatora atmosfery CO₂ (Gen Compact, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francja). Wzrost bakterii oceniano po 24 i 48 godzinach inkubacji. Następnie uzyskane kolonie bakteryjne poddano identyfikacji za pomocą systemu MALDI-TOF Biotyper Sirius IV (Billerica, MA, USA).

Wyniki

Pobrane ejakulatory charakteryzowała koncentracja, pozwalająca uzyskać powyżej 100×10⁶ plemników w każdym z badanych rozcieńczalników. Podstawowe parametry oceny mikro- oraz makroskopowej pobranych ejakulatów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Ogólna charakterystyka frakcji plemnikowej ejakulatów zakwalifikowanych do badania
Table 1. General characteristics of sperm-rich fraction of ejaculates qualified for the study

Nr psa Dog no.	Parametr oceny nasienia Semen characteristic			
	pH	Koncentracja (×10 ⁶ /ml) Concentration (×10 ⁶ /ml)	Objętość (ml) Volume (ml)	Całkowita liczba plemników (×10 ⁶) Total sperm count (×10 ⁶)
1	6,2	215,16	2,5	537,90
2	6,7	325,28	1,5	487,92
3	6,5	407,25	4,5	7832,63

Analiza ruchliwości nasienia wykazała ruch całkowity (RC) badanych ejakulatów na poziomie przekraczającym 80% w ejakulatach każdego z osobników, niezależnie od czasu przechowywania oraz we wszystkich badanych rozcieńczalnikach. Parametr ruchu postępowego (RP) wykazywał wyraźną tendencję spadkową wraz ze wzrostem czasu chłodzenia próbek. Cecha ta charakteryzowała się również większym odchyleniem standardowym, co wskazuje na większe zróżnicowanie wyników pomiędzy badanymi osobnikami: 52,06–74,7% w nasieniu natywnym, 31,55–53,69% w nasieniu przechowywanym 48 h oraz 10,54–68,15% w nasieniu przechowywanym 96 h. Najwyższy odsetek plemników martwych (33,48%) odnotowano po 48 godzinach przechowywania próbki Liz, pochodzącej od psa nr 3. Wśród wad morfologicznych, zarówno po 48, jak i 96 godzinach przechowywania nasienia, dominowały wady witki plemnika w postaci pojedynczych i mnogich zapętleń. Analiza wyników indywidualnych wykazała, że spadek odsetka plemników o prawidłowej budowie morfologicznej (poniżej 70%) zaobserwowano wyłącznie u psa nr 1 po 96 godzinach przechowywania, w grupie Antb oraz Niz. Wpływ lizozymu i nizyny na ruchliwość, budowę morfologiczną, integralność błony komórkowej oraz strukturę chromatyny w trakcie przechowywania nasienia psów w temperaturze 4°C przedstawiono w tabeli 2.

Zastosowanie wybranych bakteriostatyków w chłodzeniu nasienia psów

Tabela 2. Parametry jakościowe nasienia psów: świeżego oraz konserwowanego z dodatkiem antybiotyków, lizozymu lub nizyny
Table 2. Values of semen quality parameters in dogs: fresh and preserved semen supplemented with antibiotics, lysozyme, or nisin

Czas chłodzenia Cooling time	Rozcieńczalnik Extender	Nr psa Dog no.	Ruchliwość % Motility %		SYBR+/ PI- %	SCSA %	% plemników o prawidłowej budowie morfologicznej % of morphologically normal spermatozoa
			RC TM	RP PM	Żywe Live	DFI	
0 h	NN	1	98,82	60,65	85,04	2,74	88,15
		2	92,88	52,06	86,12	2,66	85,49
		3	99,78	74,70	85,48	5,01	78,09
		(średnia ± SD) (mean ± SD)	97,16±3,74	62,47±11,43	85,55±0,54	3,38±1,41	83,91±5,21
48 h	Antb	1	89,68	36,88	72,01	2,59	87,93
		2	98,45	53,69	73,35	1,37	85,71
		3	94,17	31,55	48,73	2,25	80,47
		(średnia ± SD) (mean ± SD)	94,10±4,39	40,71±11,56	64,70±13,84	2,07±0,63	84,70±3,83
	Liz	1	83,24	36,07	79,92	2,12	85,34
		2	93,36	50,79	79,70	1,22	80,87
		3	93,61	33,62	62,27	2,26	83,70
		(średnia ± SD) (mean ± SD)	90,07±5,92	40,16±9,29	73,96±10,13	1,87±0,56	83,31±2,26
	Niz	1	88,54	33,98	73,29	2,80	82,73
		2	93,36	50,79	79,72	1,05	83,54
		3	94,94	42,56	48,58	2,74	72,91
		(średnia ± SD) (mean ± SD)	92,28±3,33	42,44±8,41	67,20±16,44	2,20±0,99	79,73±5,92
	Antb	1	97,63	23,56	68,84	2,47	66,44
		2	99,21	45,80	72,12	1,00	81,63
		3	87,44	31,35	50,34	2,50	77,66
		(średnia ± SD) (mean ± SD)	94,76±6,39	33,57±11,28	63,77±11,74	1,99±0,86	75,24±7,88
96 h	Liz	1	87,80	10,54	67,00	2,75	70,77
		2	97,81	68,15	75,28	2,54	77,39
		3	85,90	21,80	53,71	2,35	81,62
		(średnia ± SD) (mean ± SD)	90,50±6,40	33,50±30,53	65,33±10,88	2,55±0,20	76,60±5,47
	Niz	1	87,56	14,54	70,19	2,61	60,23
		2	98,77	52,90	71,60	0,85	82,35
		3	92,57	31,92	52,58	2,23	72,91
		(średnia ± SD) (mean ± SD)	92,97±5,62	33,12±19,21	64,79±10,60	1,90±0,93	71,83±11,10

NN – nasienie natywne, DFI – indeks fragmentacji DNA, SD – odchylenie standardowe, NN – fresh raw semen, DFI – DNA fragmentation index, SD – standard deviation

Tabela 3. Szczegóły wyników badań posiewowych i antybiogramów, wykonanych dla analizowanego nasienia
 Table 3. Details of culture test results and antibiograms performed for the analyzed semen

Nr psa Dog no.	Grupa (czas przechowywania) Group (storage time)	Wyhodowane bakterie Cultured bacteria	Wzrost na podłożu Growth on the medium	Oporność wg antybiogramu Antibiogram resistance
1	0h Antb (48 h) Niz (48 h) Liz (48 h) Antb (96 h) Niz (96 h) Liz (96 h)	<i>Escherichia coli</i>	(+)	amoksycylina + kwas klawulanowy amoxicillin + clavulanic acid
3	Liz (48 h)*	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	(+)	brak none
3	Antb (96 h) Niz (96 h)	<i>Pseudomonas synxantha</i>	(+)	ceftazydym ceftazidime
3	Liz (96 h)	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	(+)	brak none

Interpretacja nasilenia wzrostu bakterii: (+) skąpy, (++) dość liczny, (+++) obfity.

Interpretation of bacterial growth intensity: (+) scanty, (++) moderate, (+++) abundant.

*Wzrost uzyskano po inkubacji w podłożu namnażającym, z posiewu bez wcześniejszego namnożenia nie stwierdzono wzrostu bakterii.

*Growth was obtained after incubation in an enrichment medium; no bacterial growth was observed from the direct culture without prior enrichment.

Otrzymane wyniki posiewów przedstawiono w tabeli 3. W badaniach hodowlanych materiału pobranego od psa nr 2 nie stwierdzono wzrostu bakterii tlenowych zarówno w próbkach nasienia świeżego, jak i w próbkach poddanych chłodzeniu w różnych rozcieńczalnikach. W związku z powyższym nie wykonywano również antybiogramu dla żadnej z próbek pochodzących od tego osobnika.

Omówienie wyników

Zastosowanie rozcieńczalników w procesie konserwacji jest kluczowe dla utrzymania zdolności zapładniającej nasienia. Każdy ze składników rozcieńczalnika odgrywa znaczącą rolę w niwelowaniu negatywnych skutków szoku chłodowego, zapewniając optymalne ciśnienie osmotyczne i chroniąc błonę komórkową plemników. Dodatek protein do opracowanych rozcieńczalników wymaga zbadania ich wpływu na jakość nasienia poddanego temu procesowi. Brak negatywnego wpływu dodatku lizozymu na parametry oceny plemników może wynikać z fizjologicznej obecności tego enzymu w płynach ustrojowych organizmu ssaków (Miao i in., 2024). Nizyna natomiast jest bakteriostatkiem syntetyzowanym w organizmach prokariotycznych – *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, a jego cytotoksyczność wykluczono podczas licznych badań *in vivo* (Ros-Santaella i in., 2024; Shin i in., 2016). Przedstawione wyniki sugerują, że zaproponowane stężenia badanych bakteriostatyków nie wpływają negatywnie na parametry oceny nasienia oraz są efektywne w działaniu bakteriostatycznym.

Przedstawiona analiza mikrobiologiczna nasienia natywnego badanych psów wykazała, że w jednym z trzech analizowanych ejakulatów nie zaobserwowano wzrostu bakterii. Dla porównania, w badaniach przeprowadzonych na większej populacji, 36,5% próbek również nie wykazywało obecności bakterii, co potwierdza znaczące różnice między osobnikami w obecności i składzie prawidłowej mikroflory nasienia psów (Sorkytė i in., 2024). Z kolei badania przeprowadzone przez Agudelo-Yepes i in., 2023 oraz Lechner i in., 2023 wykazały stałą obecność mikroorganizmów we wszystkich analizowanych próbkach pochodzących od przedstawicieli tego gatunku.

W natywnym nasieniu zdrowych psów najczęściej izolowanymi drobnoustrojami, uznawanymi za element fizjologicznej mikroflory układu rozrodczego, są bakterie z rodzajów: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. oraz *Escherichia coli* (Sorkytė i in., 2024).

Obecność tych gatunków nie zawsze wiąże się z patologią, a ich wykrycie w ejakulacie może odzwierciedlać mikroflorę naturalnie zasiedlającą cewkę moczową lub powierzchnię napletka. U jednego z samców (osobnik nr 3) stwierdzono obecność bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, które są rzadko izolowane z nasienia psów (Sorkytė i in., 2024). Bakterie te mają potencjalnie patogeny charakter, ponieważ produkują toksyny i lipopolisacharydy (LPS), które mogą uszkadzać błony komórkowe plemników, wywoływać stres oksydacyjny oraz obniżać zdolności zapładniające plemników (Ros-Santaella i in., 2024). Osobnik, w którego nasieniu wykryto ten rodzaj bakterii, nie wykazywał pogorszenia w żadnym z ocenianych parametrów nasienia, zarówno po pobraniu, jak i w trakcie przechowywania. Obserwacja ta potwierdza, że obecność w nasieniu *Pseudomonas* w skąłym wzroście (+) nie musi skutkować objawami klinicznymi i obniżeniem jakości ejakulatu. W świetle aktualnych doniesień naukowych, psy mogą pełnić rolę rezerwuaru i źródła transmisji bakterii opornych na antybiotyki β -laktamowe, w tym szczepów należących do rzędu *Enterobacterales* (de Mendieta i in., 2024). Zjawisko to stanowi istotne zagrożenie, szczególnie tam, gdzie zwierzęta towarzyszące mają bliski kontakt z człowiekiem. Wynik ten podkreśla konieczność dalszego monitorowania oporności drobnoustrojów izolowanych z nasienia oraz rozważenia stosowania alternatywnych środków przeciwdrobnoustrojowych, tj. AMPPs, w celu ograniczenia selekcji szczepów lekoopornych.

Wyniki niniejszego doświadczenia wykazały również, że dodatek bakteriostatyków w zaproponowanych stężeniach nie obniża wartości badanych parametrów jakościowych plemników. Otrzymane wyniki dotyczące ruchliwości nasienia w grupach Liz i Niz były porównywalne do tych otrzymanych w grupie kontrolnej (Antb) w każdym z badanych czasów chłodzenia. Sugai i in. (2024) po 48 godzinach chłodzenia nasienia w komercyjnym rozcieńczalniku CaniPlus Chill LT (zawierającym antybiotyki) odnotowali ponad 70% plemników o ruchliwości całkowitej i postępowej, ponad 60% plemników z integralną błoną komórkową (żywych) oraz ponad 40% plemników o prawidłowej budowie morfologicznej. Rota i in. (1999) wykorzystali rozcieńczalnik TCF-EY (zawierający benzylopenicylinę oraz siarczan dihydrostreptomycyny) do krótkoterminowego przechowywania nasienia i uzyskali $70,4 \pm 15,4\%$ ruchliwości całkowitej po 48 godzinach oraz $53,6 \pm 20,1\%$ po 96 godzinach. Podobnie jak w naszym badaniu, autorzy zastosowali również barwienie fluorescencyjne do oceny integralności błony komórkowej, uzyskując wyniki na poziomie $78,4 \pm 6,4\%$ żywych plemników po 48 godzinach oraz $72,1 \pm 10,4\%$ po 96 godzinach przechowywania w temperaturze 4°C .

Porównanie naszych wyników z danymi literaturowymi wykazuje zbliżone wartości zarówno całkowitej ruchliwości plemników: 98,45–83,24% po 48 godzinach oraz 99,21–85,90% po 96 godzinach, jak i odsetka plemników żywych z integralną błoną komórkową: 79,92–48,58% po 48 godzinach i 75,28–50,34% po 96 godzinach chłodzenia. W przytoczonych badaniach nie analizowano zmian struktury chromatyny plemnikowej. Nasze wyniki wykazały, że dla każdego osobnika w każdej z badanych grup oraz na każdym etapie przechowywania nasienia, wskaźnik fragmentacji DNA (DFI) nie przekroczył 15%, co świadczy o dobrej jakości nasienia (Niżański i in., 2012).

Przedstawione wyniki wstępnych badań wykazują potencjał bakteriostatyczny zastosowanych protein w konserwowanym nasieniu psa. Na konieczność kontynuowania badań z zastosowaniem AMPPs na większej grupie osobników wskazuje zagrożenie, jakie oporność bakterii stwarza dla zdrowia publicznego. Celowość ograniczenia stosowania antybiotyków w rozcieńczalnikach wynika również z faktu, że stwierdzony w próbkach wzrost i rodzaj bakterii nie zawsze oznacza pogorszenia jakości nasienia, czy chorobę układu rozrodczego samców (Goericke-Pesch i in., 2006; Sorkytė i in., 2024). Biorąc pod uwagę wyżej wymienione zagadnienia, autorzy planują kontynuowanie badań, rozszerzając analizę mikrobiologiczną do określenia liczby żywych bakterii, które są zdolne do utworzenia kolonii na pożywce stałej

(CFU – z ang. *Colony Forming Units*/ml). Celem tej analizy ilościowej będzie dokładna ocena efektywności bakteriostatycznej lizozymu i nizyny poprzez porównanie ich działania z rozcieńczalnikami zawierającymi antybiotyki.

Podsumowanie

Dodatek lizozymu (500 µg/ml) i nizyny (50 µg/ml) w połączeniu z EDTA (1,25 µg/ml) do rozcieńczalników stosowanych podczas chłodzenia nasienia psów wykazuje działanie bakteriostatyczne porównywalne do powszechnie stosowanych antybiotyków — benzylopenicyliny (0,06 g/100 ml) i streptomycyny (0,1 g/100 ml). Wykazano, że obecność peptydów bakteriostatycznych nie wpływa negatywnie na parametry ruchliwości i morfologii plemników ani na wyniki analiz cytometrycznych, niezależnie od czasu przechowywania nasienia. Podsumowując, uzyskane wstępne wyniki wskazują, że nizyna i lizozym mogą stanowić skuteczną alternatywę dla klasycznych antybiotyków stosowanych w rozcieńczalnikach do krótkotermowego przechowywania nasienia psów.

Piśmiennictwo

- Agudelo-Yepes S., Puerta-Suárez J., Carrillo-Gonzalez D.F., Maya W.D.C. (2023). Bacteriospermia assessment and its relationship with conventional seminal parameters in stud dogs ejaculates (*Canis familiaris*). *J. Hell. Vet. Med. Soc.*, 73 (4): 4785–4794.
- Brito L.F., da Silva M.C., Kolster K.A. (2025). Standardisation of dog sperm morphology classification. *Reprod. Domest. Anim.*, 60(2): e70024.
- de Mendieta J.M., Argüello A., Menocal M.A. et al. (2024). Emergence of NDM-producing *Enterobacterales* infections in companion animals from Argentina. *BMC Vet Res.*, 20: 174.
- Goericke-Pesch S., Weiss R., Hoffmann B. (2006). Bacterial flora in dog semen. *Hund/Katze* 34: 17–21.
- Gogol P., Trzcińska M. (2020). Integralność błon komórkowych i struktura chromatyny plemników seksowanego i nieseksowanego nasienia buhajów. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 47(2): 235–244.
- Lechner D., Aurich J., Spergser J., Aurich C. (2023). Double semen collection at a 1-h interval in dogs decreases the bacterial contamination of canine ejaculates. *Theriogenology*, 208: 126–131.
- Miao X., Zhao Y., Zhu L., Zeng Y., Yang C., Zhang R., Lund A.K., Zhang M. (2024). The equilibrium of bacterial microecosystem: probiotics, pathogenic bacteria, and natural antimicrobial substances in semen. *Microorganisms*, 12: 2253.
- Niżański W., Partyka A., Rijsselaere T. (2012) Use of fluorescent stainings and flow cytometry for canine semen assessment. *Reprod. Domest. Anim.*, 47: 215–221.
- Peña F.J., Núñez-Martínez I., Morán J.M. (2006). Semen technologies in dog breeding: an update. *Reprod. Domest. Anim.*, 41: 21–29.
- Ros-Santaella J.L., Nový P., Scaringi M., Pintus E. (2024). Antimicrobial peptides and proteins as alternative antibiotics for porcine semen preservation. *BMC Veterinary Research*, 20: 257.
- Rota A., Ström B., Linde-Forsberg C. (1995). Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 44(6): 885–900.
- Santos C.S., Silva A.R. (2020). Current and alternative trends in antibacterial agents used in mammalian semen technology. *Anim. Reprod.*, 17(1).

- Schäfer-Somi S., Colombo M., Luvoni G.C. (2022) Canine spermatozoa – predictability of cryotolerance. *Animals*, 15 (6): 733.
- Shin J.M., Gwak J.W., Kamarajan P., Fenno J.C., Rickard A.H., Kapila Y.L. (2016). Biomedical applications of nisin. *J Appl Microbiol*, 120: 1449–1465.
- Sorkytė Š., Šiugždinienė R., Virgailis M., Vaičiulienė G., Wysokińska A., Wójcik E., Matusevičius P., Rekešiūtė A., Sutkevičienė N. (2024). The interaction between canine semen bacteria and semen quality parameters. *Animals*, 14(15): 2151.
- Sugai N., Werre S., Cecere J.T., Balogh O. (2024). Comparing different sperm concentrations for optimizing cooled semen use in the dog. *Front. Vet. Sci.*, 10, 1339840.

Zatwierdzono do druku: 25 IX 2025

USE OF LYSOZYME AND NISIN AS BACTERIOSTATIC AGENTS IN DOG SEMEN PRESERVATION – PRELIMINARY STUDIES

Oksana Pulkowska-Bluj, Monika Trzcińska, Paweł Stefanowicz

SUMMARY

The present study aimed to evaluate the bacteriostatic effectiveness of nisin (Niz) and lysozyme (Liz), as well as to assess their impact on the quality of short-term stored dog semen. Each ejaculate was evaluated immediately after collection (0 h), diluted in a Tris-citrate-fructose egg yolk (TCF-EY) extender, and divided into the following groups: “Antb” (benzylpenicillin 0.06 g/100 ml + streptomycin 0.1 g/100 ml); “Niz” (nisin 50 µg/ml + EDTA 1.25 µg/ml); and “Liz” (lysozyme 500 µg/ml). Mean values of sperm motility, morphology, plasma membrane integrity and chromatin structure were compared between groups. Bacteriological examination and antibiograms were performed for samples after 48 and 96 hours of storage at 4°C. Microbiological testing showed that: not all ejaculates contained aerobic bacteria, the addition of Niz and Liz exerted bacteriostatic effects comparable to those of conventional antibiotics, bacteria from the *Enterobacteriaceae* family isolated from the samples were resistant to amoxicillin with clavulanic acid. Furthermore, the presence of *Enterobacter* spp. in semen may reduce its ability to maintain quality during cooling. The obtained results suggest that nisin and lysozyme may serve as an alternative to conventional antibiotics for short-term storage of canine semen.

Keywords: canine semen, cooling, nisin, lysozyme, semen preservation, bacteriostatics