

CHẤT LƯỢNG TINH DỊCH VÀ SỰ PHÁT TRIỂN CỦA VI KHUẨN TRONG MÔI TRƯỜNG BẢO QUẢN TINH DỊCH LỢN KHÔNG CHỨA KHÁNG SINH Ở NHIỆT ĐỘ THẤP

Bùi Huy Doanh*, Đinh Thị Yên, Đặng Thái Hải, Phạm Kim Đăng

Khoa Chăn nuôi, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

**Tác giả liên hệ: bhdoanh@vnua.edu.vn*

Ngày nhận bài: 19.02.2021

Ngày chấp nhận đăng: 13.07.2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá chất lượng tinh dịch và sự phát triển của tổng số vi khuẩn hiếu khí trong môi trường bảo quản tinh dịch lợn không chứa kháng sinh ở 5°C. Tinh dịch lợn Duroc sau khai thác được bảo quản trong môi trường BTS và AndroStar Premium có chứa kháng sinh ở 17°C và không chứa kháng sinh ở 5°C. Các mẫu tinh dịch được kiểm tra hoạt lực, tỉ lệ tinh trùng kỳ hình và sự phát triển của tổng số vi khuẩn hiếu khí sau 24, 72 và 120 giờ bảo quản. Kết quả cho thấy tinh dịch bảo quản ở 5°C trong môi trường AndPre có hoạt lực tinh trùng trên 75% sau 5 ngày bảo quản và không có sự sai khác so với mẫu đối chứng bảo quản ở 17°C ($P < 0,05$). Tỉ lệ tinh trùng kỳ hình trong mẫu tinh dịch bảo quản ở 5°C trong môi trường AndPre tương tự như các mẫu bảo quản ở 17°C ($P > 0,05$). Tổng số vi khuẩn hiếu khí trong các mẫu tinh dịch bảo quản ở 5°C không chứa kháng sinh luôn nhỏ hơn 10^3 CFU/ml, không có sự sai khác so với các mẫu tinh dịch bảo quản ở 17°C ($P > 0,05$). Do đó, bảo quản tinh dịch trong môi trường AndPre không có kháng sinh ở 5°C không ảnh hưởng đến chất lượng tinh dịch, đồng thời góp phần hạn chế việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi.

Từ khóa: Tinh dịch, bảo quản, chất lượng tinh, nhiệt độ, vi khuẩn.

Semen Quality and Bacterial Growth in Boar Semen Extender Preserved at Low Temperature

ABSTRACT

This study was to evaluate the effect of hypothermic preservation strategy on semen quality as well as the bacterial growth in antibiotic-free extender at 5°C. Diluted boar semen containing antibiotic were stored in BTS and AndroStar Premium extenders at 17°C while antibiotic-free semen were stored at 5°C. Sperm motility, proportion of abnormal spermatozoa and bacterial growth after 24, 72 and 120 hours preservation were investigated. The results showed that the boar spermatozoa preserved in antibiotic-free AndroStar Premium extender at 5°C maintained high motility above 75% after 5 days of preservation and did not significantly differ from the control stored at 17°C in extender containing antibiotic ($P < 0.05$). The proportion of abnormal spermatozoa in semen samples stored in AndPre extender at 5°C was similar to the samples stored in BTS and AndPre extenders at 17°C ($P > 0.05$). The number of aerobic bacteria in semen samples stored at 5°C in antibiotic-free extenders was lower than 10^3 CFU/ml after 24, 72 and 120 hours preservation and did not differ significantly with samples containing antibiotic extender stored at 17°C ($P > 0.05$). Therefore, semen preservation in antibiotic-free AndPre extender at low temperatures might be applied to minimize the use of antibiotics in livestock.

Keywords: Semen, preservation, semen quality, temperature, bacteria.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay trên thế giới, hơn 90% lợn nái được thụ tinh nhân tạo (TTNT) bằng tinh dịch bảo quản dạng lỏng có thời gian đến 5 ngày (Riesenbeck, 2011). Quá trình khai thác và bảo

quản tinh dịch lợn ở nước ta hiện nay cũng chưa được quan tâm thích đáng. Tinh dịch lợn chủ yếu vẫn được cung cấp trực tiếp cho các trang trại trong hệ thống hoặc các địa phương lân cận. Trong khi các nghiên cứu về chất lượng tinh dịch hiện nay được bảo quản ở nhiệt độ 17°C

(Hà Xuân Bộ & cs., 2011; Hà Xuân Bộ & cs., 2013). Nghiên cứu về bảo quản tinh dịch lợn ở nhiệt độ thấp và ảnh hưởng của nhiệt độ thấp đến chất lượng tinh dịch cũng như khả năng thụ tinh của tinh trùng hầu như chưa có ở Việt Nam. Bảo quản tinh ở nhiệt độ thấp có ưu điểm: giảm sự trao đổi chất ở tinh trùng, hạn chế sự phát triển của vi khuẩn cũng như giảm sử dụng kháng sinh trong môi trường bảo quản. Tuy nhiên, màng tế bào tinh trùng lợn có nhiều điểm khác biệt so với các tinh trùng động vật khác như lượng cholesterone thấp, tỉ lệ axit béo không bão hòa/axit béo bão hòa cao nên tinh trùng lợn rất mẫn cảm với nhiệt độ nói chung và shock lạnh nói riêng, dẫn tới ảnh hưởng đến tính chất của màng tế bào (Yeste, 2015; Jäkel & cs., 2021b).

Hơn nữa, tinh dịch lợn rất dễ bị nhiễm khuẩn trong quá trình khai thác, pha loãng, bảo quản và đây là một trong những nguyên nhân ảnh hưởng đến chất lượng tinh dịch theo thời gian bảo quản, làm giảm tỉ lệ thụ thai. Trong tinh dịch được bảo quản, vi khuẩn tác động đến khả năng di chuyển của tinh trùng và gây ra những biến đổi bất thường về mặt hình thái (Auroux & cs., 1991; Ubeda & cs., 2013), gây đông vón tinh dịch (Wolff & cs., 1993), giảm tính nguyên vẹn của màng acrosome và khả năng sống (El-Mulla & cs., 1996; Sepúlveda & cs., 2014). Ngoài ra, vi khuẩn cũng có thể là nguồn lây lan bệnh từ đực giống sang nhiều con cái khác. Vi khuẩn cũng có thể làm giảm sức khỏe và khả năng thụ thai của con cái (Payne & cs., 2008; Martín & cs., 2010). Một nghiên cứu tại Ba Lan cho biết, sự nhiễm khuẩn xảy ra ở 99% mẫu tinh dịch lợn (Gączarzewicz & cs., 2016). Sự nhiễm khuẩn này chủ yếu do nhóm vi khuẩn Gram (-) phổ biến nhất là họ *Enterobacteriaceae* (Gączarzewicz & cs., 2016; Waberski & cs., 2019a), ngoài ra còn có nhóm vi khuẩn Gram (+) như *Lactobacillus* (Schulze & cs., 2018). Việc bổ sung kháng sinh vào môi trường pha loãng và bảo quản tinh dịch lợn là cần thiết để giảm thiểu ảnh hưởng của vi khuẩn. Tuy nhiên, việc bổ sung kháng sinh cũng có thể làm xuất hiện các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh (Speck & cs., 2014; Schulze &

cs., 2017). Đặc biệt, sự kháng kháng sinh ở người đang là thách thức lớn đối với nhân loại. Việc hạn chế sử dụng kháng sinh đã được nhiều nước trên thế giới đưa thành đạo luật. Tại Việt Nam, theo Bộ NN&PTNT, trong mỗi chu kỳ chăn nuôi 72% số trang trại sử dụng ít nhất một loại kháng sinh để phòng bệnh và kích thích sinh trưởng. Trong chăn nuôi lợn, có đến 286,6mg hoạt chất/kg lợn hơi (QĐ 2625/QĐ-BNN-TY). Điều đó cho thấy vấn đề lạm dụng kháng sinh và kháng kháng sinh ở nước ta ngày càng nghiêm trọng. Đối với việc TTNT ở lợn, trong vòng hai giờ đầu sau thụ tinh có tới 70-90% liều tinh (30-80ml) từ đường sinh dục lợn nái được thải ra ngoài, trong đó có kháng sinh và vi khuẩn sẽ xâm nhập vào chuỗi thức ăn của con người (Waberski & cs., 2019a). Trong đó, bảo quản ở nhiệt độ thấp cũng là một giải pháp làm giảm khả năng phát triển của vi khuẩn mà không phải sử dụng kháng sinh. Một số nghiên cứu về việc bảo quản và sử dụng tinh trùng ở 5°C cũng đã được công bố và bước đầu có kết quả khả quan (Schmid & cs., 2013a; Schmid & cs., 2013b; Waberski & cs., 2019a; Menezes & cs., 2020; Jäkel & cs., 2021a). Tuy nhiên, việc bảo quản tinh dịch ở 5°C gặp nhiều khó khăn do quá trình hạ nhiệt độ từ khi khai thác, sau khi pha loãng xuống 5°C khi bảo quản tác động mạnh tới chất lượng tinh trùng. Xuất phát từ thực tế đó, nghiên cứu này nhằm đánh giá chất lượng tinh dịch và tổng số vi khuẩn hiếu khí trong môi trường bảo quản tinh dịch lợn không chứa kháng sinh ở 5°C.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Số lượng 30 mẫu tinh nguyên được khai thác từ 06 lợn đực Duroc khỏe mạnh từ 2 đến 4 năm tuổi nuôi tại Công ty Cổ phần Giống gia súc Hà Nội từ tháng 5 đến tháng 11/2020. Các đực giống được nuôi dưỡng và chăm sóc trong cùng điều kiện, có máng ăn, máng uống riêng và được tiêm phòng vacxin đầy đủ. Nghiên cứu sử dụng hai loại môi trường bảo quản tinh dịch dạng lỏng: (1) Beltsville Thawing Solution (BTS) là môi trường bảo quản từ 1 đến 3 ngày)

Chất lượng tinh dịch và sự phát triển của vi khuẩn trong môi trường bảo quản tinh dịch lợn không chứa kháng sinh ở nhiệt độ thấp

gồm Glucose, Hepes, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, KCl, NaHCO_3 , Ethylene Diaminete Traacetic axit; (2) AndroStar Premium (AndPre) là môi trường bảo quản từ 3 đến 7 ngày gồm Glucose, Hepes, KCl, NaHCO_3 , Ethylene Diaminete Traacetic axit, ... của Công ty Minitube (Tiefenbach, CHLB Đức).

2.2. Nội dung nghiên cứu

Ngay sau khi khai thác, tinh dịch lợn được kiểm tra thể tích, nồng độ, hoạt lực tinh trùng và tỉ lệ tinh trùng kỳ hình trước khi pha trong môi trường bảo quản dạng lỏng. Chất lượng tinh dịch đưa vào nghiên cứu đạt các chỉ tiêu theo TCVN 9111:2011, giống lợn ngoại - Yêu cầu kỹ thuật (hoạt lực > 80%; tỉ lệ kỳ hình < 15%, mật độ tinh trùng > 250 triệu/ml). Tinh dịch lợn được bảo quản ở 4 công thức thí nghiệm khác nhau (Bảng 1). Môi trường BTS được dùng để so sánh như mẫu đối chứng dương ở 17°C, đối chứng âm ở 5°C. Các môi trường bảo quản tinh dịch sử dụng trong nghiên cứu được sản xuất theo đơn đặt hàng của nhóm nghiên cứu với công ty Minitube (Tiefenbach, CHLB Đức). Hai môi trường bảo quản ở 17°C có bổ sung 0,25 mg/ml kháng sinh gentamicin sulphate tương tự như việc bổ sung trong các sản phẩm thương mại trên thị trường. Tinh dịch của mỗi đực giống được pha thành 5 liều (90 ml/liều, 20 triệu tinh trùng/ml) dùng để phân tích hoạt lực tinh trùng, tỉ lệ tinh trùng kỳ hình sau 24, 48, 72 và 120 giờ bảo quản và sự phát triển của vi khuẩn sau 24, 72 và 120 giờ bảo quản trong tủ bảo quản có hệ thống điều khiển và theo dõi nhiệt độ.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Tinh dịch khai thác từ lợn đực giống được thực hiện vào buổi sáng với chu kỳ khai thác 1 lần/tuần. Mẫu tinh dịch bảo quản ở 17°C được để ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 2 giờ trước khi cho vào tủ bảo quản ở 17°C. Các mẫu tinh dịch bảo quản ở 5°C được để ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 2 giờ sau đó để 3 giờ ở 10°C sau đó được chuyển vào tủ bảo quản 5°C.

Hoạt lực tinh trùng (A, $0\% \leq A \leq 100\%$) được xác định bằng hệ thống phân tích tinh dịch tự động (Computer assisted sperm analysis, AndroVision (Minitube, Đức)), sử dụng lam kính bốn buồng đếm với độ sâu 20µm (Leja,

Nieuw Venne, Netherlands) với kính hiển vi có độ phóng đại 100 lần. Các mẫu tinh dịch bảo quản được trộn đều sau đó lấy khoảng 2ml đem ủ trong bể ấm 38°C trong 30 phút trước khi kiểm tra trên hệ thống AndroVision có kính hiển vi, lam kính cũng được cài đặt nhiệt độ ở 38°C. Hoạt lực tinh trùng của các mẫu tinh dịch pha loãng được đánh giá (24, 48, 72 và 120 giờ) sau khi bảo quản và được thực hiện tại Công ty Giống gia súc Hà Nội.

Nồng độ tinh trùng (C, triệu/ml) được xác định bằng buồng đếm Neubauer trên kính hiển vi có độ phóng đại 400 lần (Paulenz & cs., 1995).

Tổng số tinh trùng tiến thẳng (VAC, tỷ/lần) được xác định bằng tích của ba chỉ tiêu V, A và C.

Tỉ lệ tinh trùng kỳ hình (K, %) được xác định bằng số tinh trùng kỳ hình (có hình thái không bình thường) trên tổng số 200 tinh trùng trong dung dịch 4% formol citrate trên kính hiển vi có độ phóng đại 1.000 lần với vật kính soi dầu. Tỉ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh nguyên và sau 24, 48, 72 và 120 giờ sau khi bảo quản của tinh pha loãng. Hình thái không bình thường của tinh trùng được xác định thông qua việc kiểm tra hình dáng của đầu, cổ và đuôi tinh trùng. Phần đầu tinh trùng: hình thái bất thường của đầu; sự có mặt của các giọt bào tương ở phần đầu. Phần cổ tinh trùng: tinh trùng kỳ hình cổ và sự có mặt của các giọt bào tương ở cổ. Phần thân tinh trùng: hình thái thân tinh trùng và sự có mặt của các giọt bào tương ở thân. Phần đuôi tinh trùng: hình thái của đuôi (đuôi cong, đuôi cuộn) và sự có mặt của các giọt bào tương ở đuôi. Tỉ lệ tinh trùng tổn thương acrosome của tinh nguyên và tinh dịch bảo quản sau 24, 48, 72 và 120 giờ cũng được thực hiện tương tự như kiểm tra hình thái tinh trùng. Trong đó 200 tinh trùng được kiểm tra hình thái bất thường của acrosome như acrosome bị hỏng, màng acrosome bị bong, màng không cân đối hay màng quá mỏng.

Việc kiểm tra sự phát triển của vi khuẩn trong tinh dịch lợn được tiến hành tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm công nghệ sinh học Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Tổng số vi khuẩn hiếu khí được xác định trên môi trường thạch thường ở 37°C/24 giờ theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 4884-1:2015.

Bảng 1. Công thức bảo quản tinh dịch

Thành phần	AndPre-17°C	BTS-17°C	AndPre-5°C	BTS-5°C
5°C			+	+
17°C	+	+		
BTS		+		+
AndPre	+		+	
Gentamicin sulphate	+	+		

Ghi chú: + là có áp dụng với công thức thí nghiệm.

Bảng 2. Chất lượng tinh dịch lợn Duroc (n = 30)

Chỉ tiêu	Mean $\pm$ SD	Cv (%)
Thể tích (ml)	234,12 $\pm$ 42,83	14,61
Hoạt lực tinh trùng (%)	85,80 $\pm$ 4,25	4,82
Nồng độ tinh trùng (triệu/ml)	329,40 $\pm$ 54,30	18,25
Tổng số tinh trùng tiến thẳng (tỷ/lần)	65,55 $\pm$ 13,84	21,43
Tỉ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	9,44 $\pm$ 3,60	36,38

Bảng 3. Hoạt lực tinh trùng (%) qua các thời gian bảo quản (LSM)

Thời gian bảo quản	AndPre-17°C	BTS-17°C	AndPre-5°C	BTS-5°C	SEM
24h	84,40 ^a	82,40 ^{ab}	81,80 ^b	67,40 ^c	0,66
48h	82,40 ^a	77,20 ^b	77,92 ^b	60,80 ^c	0,69
72h	80,40 ^a	74,80 ^b	76,92 ^b	58,80 ^c	0,94
120h	77,08 ^a	70,80 ^b	75,92 ^a	57,40 ^c	0,60

Ghi chú: Trong cùng một hàng các giá trị LSM có các chữ cái khác nhau cho biết sự sai khác có ý nghĩa giữa các điều kiện bảo quản ($P < 0,05$); $n = 30$ đối với từng công thức thí nghiệm.

2.4. Xử lý số liệu

Các chỉ tiêu V, A, C, VAC và K của tinh nguyên được trình bày bằng các tham số thống kê mô tả gồm: giá trị trung bình cộng (Mean), độ lệch chuẩn (SD) và hệ số biến động (Cv). Số liệu về tổng số vi sinh vật hiếu khí trong tinh nguyên và tinh dịch qua các ngày bảo quản (CFU/ml) được chuyển sang logarit cơ số 10 trước khi xử lý thống kê.

Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện bảo quản ở từng thời điểm đến các chỉ tiêu chất lượng tinh dịch theo mô hình: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$, trong đó: Y_{ij} : các chỉ tiêu phẩm chất tinh dịch; μ : trung bình chung; α_i : ảnh hưởng của môi trường bảo quản ở các thời điểm khác nhau; ε_{ij} : sai số ngẫu nhiên. Các tham số ước tính bao gồm giá trị trung bình bình phương bé nhất (LSM) và

sai tiêu chuẩn (SEM). So sánh sự sai khác giữa các giá trị LSM bằng phép thử Tukey. Số liệu được xử lý bằng thủ tục GLM của phần mềm phân mềm xử lý SAS (version 9.4, Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả từ 30 mẫu tinh nguyên của 06 đực cho thể tích tinh dịch trung bình đạt 234,12 ml/lần khai thác với hoạt lực đạt 85,80% và nồng độ tinh trùng là 329,40 triệu/ml, chỉ tiêu VAC đạt 65,55 tỷ/lần. Tỉ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh nguyên khoảng 9,44% (Bảng 2). Các chỉ tiêu về chất lượng tinh dịch sau khai thác đều phù hợp với tiêu chuẩn quốc gia TCVN 9111:2011 về giống lợn ngoại - Yêu cầu kỹ thuật. Một nghiên cứu tại Ba Lan cũng cho biết

thể tích tinh dịch và nồng độ tinh trùng của hai giống lợn Landrace và Duroc lần lượt là 203,03ml và 200,50ml; 308,71 (triệu/ml) và 359,38 (triệu/ml) (Jaishankar & cs., 2018). Kết quả về chỉ tiêu VAC cao hơn so với lợn đực Pietrain kháng stress (43,93 tỷ/lần) (Hà Xuân Bộ & cs., 2013).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hoạt lực tinh trùng chịu ảnh hưởng của thời gian bảo quản cũng như môi trường và nhiệt độ bảo quản ($P < 0,05$) (Bảng 3). Hoạt lực tinh trùng cao nhất ở các mẫu tinh dịch ở 24 giờ bảo quản sau đó giảm dần và thấp nhất ở 120 giờ bảo quản ($P < 0,05$). Tuy nhiên, sau 120 giờ bảo quản, chỉ có các mẫu tinh dịch bảo quản trong môi trường BTS và AndPre ở 17°C và AndPre ở 5°C có hoạt lực tinh trùng lần lượt là 70,8%, 75,9% và 77,1% đáp ứng tiêu chuẩn dùng trong TTNT cho tinh dịch bảo quản (Waberski & cs., 2019b).

Qua các ngày bảo quản, hoạt lực tinh trùng cao nhất ở các mẫu tinh dịch bảo quản trong môi trường AndPre-17°C và thấp nhất ở các mẫu tinh dịch bảo quản trong môi trường BTS ở 5°C ($P < 0,05$). Tinh dịch bảo quản trong môi trường BTS ở 5°C có hoạt lực tinh trùng tương đối thấp (67,40% ở 24 giờ xuống 57,40% ở 120 giờ bảo quản). Kết quả này thấp hơn so với công bố của Waberski & cs. (2019) khi hoạt lực tinh trùng lợn trong môi trường BTS ở 24 giờ là 75,3% và sau 144 giờ là 66,7% (Waberski & cs., 2019a). Các mẫu tinh dịch bảo quản trong môi trường AndPre ở 5°C từ 24 giờ đến 120 giờ đều có hoạt lực tinh trùng trên 75% (cao nhất là 81,8% sau 24 giờ; thấp nhất là 75,9% sau 120 giờ bảo quản). Phân tích thống kê cho thấy, sau 24, 48 và 72 giờ bảo quản không có sự sai khác về hoạt lực tinh trùng giữa môi trường BTS ở 17°C và AndPre ở 5°C ($P > 0,05$), hơn nữa sau 120 giờ bảo quản thì hoạt lực tinh trùng ở môi trường AndPre ở 5°C còn cao hơn (75,92% so với 70,80%) ($P < 0,05$). Điều này có thể giải thích do môi trường BTS là môi trường bảo quản ngắn ngày, còn AndPre là môi trường bảo quản dài ngày nên thành phần môi trường cũng có sự khác biệt và thực tế cũng ít trang trại sử dụng tinh dịch pha trong môi trường BTS để TTNT sau 72 giờ. Việc bổ sung 0,25 mg/ml gentamicin sulphate trong môi trường bảo quản không ảnh

hưởng đến chất lượng tinh dịch (số liệu không công bố). Mục đích của việc bổ sung kháng sinh trong môi trường bảo quản nhằm ức chế sự phát triển của vi sinh vật trong tinh dịch được bảo quản ở nhiệt độ 15-17°C. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với công bố của Waberski & cs. (2019a) trên hai môi trường BTS và AndroStar. Nghiên cứu trong môi trường BTS ở 5°C, Schmid & cs. (2013a) cho biết hoạt lực tinh trùng sau 24 giờ và 96 giờ lần lượt là (69% và 63%). Tương tự trong nghiên cứu ở môi trường Adrostar Plus ở 5°C thì hoạt lực tinh trùng sau 24 giờ và 96 giờ (85,2% và 80,9%) cao hơn so với tinh dịch bảo quản trong môi trường BTS (69,3% và 63,7%) (Schmid & cs., 2013b). Điều đặc biệt ở đây là trong môi trường bảo quản AndPre ở 5°C cho hoạt lực tinh trùng đáp ứng được trong TTNT đến 120 giờ bảo quản. Kết quả phân tích phương sai hai nhân tố cho thấy có sự tương tác giữa nhiệt độ bảo quản và thời gian bảo quản đến hoạt lực tinh trùng ($P < 0,05$). Các kết quả trên cho thấy có sự ảnh hưởng của nhiệt độ cũng như môi trường bảo quản đến hoạt lực của tinh trùng. Đặc biệt, nhiệt độ là yếu tố quan trọng có ảnh hưởng đến chất lượng tinh trùng bảo quản. Hơn nữa, nhiệt độ không chỉ ảnh hưởng đến hoạt lực tinh trùng mà còn ảnh hưởng đến tính thẩm thấu của màng, sự trao đổi canxi (Schmid & cs., 2013a). Ở nhiệt độ thấp, hoạt động chức năng của ty thể giảm, dẫn đến giảm lượng ATP, ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất, là nguyên nhân giảm hoạt lực của tinh trùng (Nguyen & cs., 2016; Nesci & cs., 2020). Nhiệt độ thấp đã tác động tới cấu trúc của màng, làm thay đổi tính chất của lớp phospholipid kép và tính thẩm thấu của màng (Pursel & cs., 1973; De Leeuw & cs., 1990; Drobnis & cs., 1993; Buhr & cs., 1989; Schmid & cs., 2013a). Sự pha loãng và bảo quản tinh dịch có ảnh hưởng lớn đến môi trường sống của tinh trùng. Do vậy, quá trình bảo quản tinh dịch cũng như nhiệt độ bảo quản cần đảm bảo thành phần và áp suất thẩm thấu để giảm thiểu sự tác động đến tinh trùng.

Bên cạnh hoạt lực, hình thái tinh trùng cũng là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng tinh dịch. Tinh trùng có hình thái nguyên vẹn sau khi bảo quản mới có khả năng thụ tinh:

ví dụ màng acrosome nguyên vẹn đảm bảo cho quá trình xâm nhập vượt qua các hàng rào xung quanh trứng. Kết quả ở bảng 4 cho thấy, tỉ lệ tinh trùng có màng acrosome bất thường qua các ngày bảo quản thấp nhất trong môi trường AndPre ở 17°C và cao nhất trong môi trường BTS ở 5°C ($P < 0,05$). Tuy nhiên, không có sự sai khác về tỉ lệ màng acrosome bất thường giữa môi trường BTS ở 17°C với hai môi trường AndPre và BTS bảo quản ở 5°C ($P > 0,05$). Tinh dịch bảo quản trong môi trường BTS ở 17°C có tỉ lệ tinh trùng có màng acrosome bị hỏng tăng lên qua các ngày bảo quản 3,96% ở 24 giờ lên 5,09% ở 120 giờ. Tỉ lệ hỏng màng acrosome thấp nhất sau 24 giờ, tăng dần qua các ngày và cao nhất sau 120 giờ bảo quản, tuy nhiên sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Tinh dịch bảo quản sau 24 giờ trong môi trường BTS ở 5°C bị ảnh hưởng nhiều nhất (5,08%); thấp nhất trong môi trường AndPre ở 17°C (3,73%). Xu hướng này cũng lặp lại qua các ngày bảo quản BTS ở 17°C và 5°C lần lượt là 5,09% và 6,21%; AndPre ở 17°C và 5°C là 4,83% và 5,45%. Các tinh trùng kỳ hình ở acrosome chủ yếu là bị bong màng, màng mọc lệch, mất cân đối ở màng hoặc màng quá mỏng. Kết quả phân tích thống kê cho thấy, nhiệt độ bảo quản không ảnh hưởng lớn đến chất lượng màng acrosome khi tỉ lệ màng bị hỏng ở 5°C không sai khác so với mẫu tinh trùng được bảo quản trong môi trường BTS ở 17°C ($P > 0,05$). Có sự tương tác giữa thời gian bảo quản và nhiệt độ bảo quản đến hình thái acrosome ($P < 0,05$). Trong mẫu tinh dịch lợn bảo quản ở 17°C, tỉ lệ màng acrosome nguyên vẹn, giảm dần từ trên 90% trong tinh nguyên, 87% sau 1 ngày bảo quản và khoảng 83% sau 5 ngày (Gaczarzewicz & cs., 2016). Theo Weize (2011), tỉ lệ tinh trùng kỳ hình ở acrosome ở lợn cho thụ tinh ở Đức không được vượt quá 10%. Đối chiếu với yêu cầu trên thì tỉ lệ tinh trùng kỳ hình ở acrosome trong các mẫu tinh dịch bảo quản đều đáp ứng yêu cầu về chất lượng tinh trùng cho TTNT.

Thực nghiệm đã cho thấy có sự tương quan giữa hình thái tinh trùng bị biến đổi và khả năng thụ tinh. Có mối tương quan nghịch giữa tỉ lệ tinh trùng có bong nguyên sinh chất ở xa và tỉ

lệ thụ tinh: những bong nguyên sinh chất ở xa ít có hại hơn những bong nguyên sinh chất ở gần (Johnson & cs., 2000). Tỉ lệ tinh trùng kỳ hình qua các thời gian bảo quản trong các điều kiện khác nhau được trình bày ở bảng 5. Ở nhiệt độ 17°C, sau 24 giờ và 120 giờ bảo quản, tỉ lệ tinh trùng kỳ hình ở môi trường BTS là 11,75% và 13,85%; môi trường AndPre là 11,58% và 13,90%. Ở 5°C, tỉ lệ tinh trùng kỳ hình trong môi trường BTS tăng lên từ 14,51% sau 24 giờ bảo quản lên 17,32% sau 120 giờ. Ở môi trường AndPre tỉ lệ này tăng lên từ 13,18% lên 14,78%. Qua các ngày bảo quản, tỉ lệ tinh trùng kỳ hình thấp nhất trong môi trường AndPre bảo quản ở 17°C ($P < 0,05$), không có sự sai khác giữa 2 môi trường bảo quản ở 17°C ($P > 0,05$). Đặc biệt không có sự sai khác về tỉ lệ tinh trùng kỳ hình giữa môi trường BTS ở 17°C và hai loại môi trường bảo quản ở 5°C ($P > 0,05$). Trong các mẫu tinh dịch bảo quản ở 5°C thì mẫu trong môi trường AndPre có tỉ lệ kỳ hình thấp hơn. Tuy nhiên, các sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). So sánh với tiêu chuẩn của các tổ chức quốc tế về chất lượng tinh trùng dành cho bảo quản thì kết quả của nghiên cứu trong cả 2 môi trường đều đáp ứng được cho TTNT. Theo Hiệp hội Chăn nuôi Đức và Mỹ thì tỉ lệ kỳ hình tối đa lần lượt là 25% và 30% (Waberski & cs., 2019b). Khi so sánh với tiêu chuẩn quốc gia TCVN 9111:2011 về giống lợn ngoại - Yêu cầu kỹ thuật, tỉ lệ tinh trùng kỳ hình phải thấp hơn 15% thì mẫu tinh dịch bảo quản trong môi trường BTS ở 5°C không đạt tiêu chuẩn sau 48, 72 và 120 giờ bảo quản. Nghiên cứu sử dụng môi trường BTS ở 5°C với mục đích là đối chứng âm cho thí nghiệm để so sánh với môi trường AndPre. Hệ đệm trong môi trường BTS không đáp ứng được cho việc bảo quản ở nhiệt độ thấp. Mặt khác, tỉ lệ kỳ hình trong TCVN 9111:2011 là tiêu chuẩn của tinh dịch sau khi khai thác chứ không đề cập đến chất lượng của tinh trùng sau bảo quản. Thực tế cũng đã chứng minh chất lượng tinh trùng của tinh dịch sau khi pha loãng và bảo quản sẽ thấp hơn so với tinh trùng sau khai thác kể cả về hoạt lực và hình thái tinh trùng. Kết quả phân tích phương sai hai nhân tố cho thấy có sự tương tác giữa nhiệt độ bảo quản và thời gian bảo quản đến tỉ lệ tinh trùng kỳ hình ($P < 0,05$).

Chất lượng tinh dịch và sự phát triển của vi khuẩn trong môi trường bảo quản tinh dịch lợn không chứa kháng sinh ở nhiệt độ thấp

Bảng 4. Tỷ lệ tinh trùng tổn thương màng acrosome (%) qua các thời gian bảo quản (LSM)

Thời gian bảo quản	AndPre-17°C	BTS-17°C	AndPre-5°C	BTS-5°C	SEM
24h	3,73 ^a	3,96 ^{ab}	4,58 ^{ab}	5,08 ^b	0,3201
48h	4,19 ^a	4,39 ^{ab}	4,95 ^{ab}	5,27 ^b	0,2655
72h	4,49 ^a	4,99 ^{ab}	5,14 ^{ab}	5,80 ^b	0,2930
120h	4,83 ^a	5,09 ^{ab}	5,45 ^{ab}	6,21 ^b	0,3178

Ghi chú: Trong cùng một hàng các giá trị LSM có các chữ cái khác nhau cho biết sự sai khác có ý nghĩa giữa các điều kiện bảo quản ($P < 0,05$); $n = 30$ đối với từng công thức thí nghiệm.

Bảng 5. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%) qua các thời gian bảo quản (LSM)

Thời gian bảo quản	AndPre-17°C	BTS-17°C	AndPre-5°C	BTS-5°C	SEM
24h	11,58 ^b	11,75 ^b	13,18 ^{ab}	14,51 ^a	0,7084
48h	11,90 ^b	12,42 ^b	14,12 ^{ab}	15,80 ^a	0,8926
72h	12,59 ^b	13,07 ^b	14,40 ^{ab}	16,71 ^a	0,9175
120h	13,90 ^b	13,85 ^b	14,78 ^{ab}	17,32 ^a	0,9154

Ghi chú: Trong cùng một hàng các giá trị LSM có các chữ cái khác nhau cho biết sự sai khác có ý nghĩa giữa các điều kiện bảo quản ($P < 0,05$); $n = 30$ đối với từng công thức thí nghiệm.

Bảng 6. Phát triển của vi khuẩn (logarit cơ số 10 của CFU/ml) qua các thời gian bảo quản (LSM)

Thời gian bảo quản	AndPre-17°C	BTS-17°C	AndPre-5°C	BTS-5°C	SEM
24h	2,62 ^a	2,57 ^a	2,68 ^a	2,47 ^a	0,2049
72h	3,09 ^a	2,98 ^a	2,82 ^a	2,81 ^a	0,1447
120h	2,72 ^a	2,67 ^a	2,85 ^a	2,59 ^a	0,1889

Ghi chú: Trong cùng một hàng các giá trị LSM có các chữ cái khác nhau cho biết sự sai khác có ý nghĩa giữa các điều kiện bảo quản ($P < 0,05$); $n = 6$ đối với từng công thức thí nghiệm.

Việc hạn chế sử dụng kháng sinh trong môi trường bảo quản để ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn, đảm bảo khả năng thụ thai của tinh trùng là một trong những thách thức lớn. Một số nghiên cứu cũng đã chỉ ra tổng số vi khuẩn hiếu khí trong tinh dịch lợn khi cho thụ tinh nằm trong khoảng 10^3 - 10^7 CFU/ml không ảnh hưởng quá lớn đến kết quả thụ thai (Althouse & cs., 2000; Jäkel & cs., 2021b). Tuy nhiên, khi cho giao phối tự nhiên thì lượng vi khuẩn xâm nhập vào đường sinh dục lợn nái có thể lên đến 10^9 CFU/ml (Althouse & cs., 2000; Schulze & cs., 2015). Kết quả nghiên cứu trên 6 mẫu tinh dịch cho thấy, tổng số vi khuẩn hiếu khí trong tinh nguyên là $1,35 \times 10^3$ CFU/ml. Trong môi trường bảo quản có chứa kháng sinh ở 17°C: tổng số vi khuẩn hiếu khí trong tinh dịch bảo quản ở môi

trường BTS lần lượt là $1,00 \times 10^3$ CFU/ml; $0,66 \times 10^3$ CFU/ml và $0,55 \times 10^3$ CFU/ml sau 24, 72 và 120 giờ; trong môi trường AndPre là $1,30 \times 10^3$ CFU/ml; $0,76 \times 10^3$ CFU/ml và $0,60 \times 10^3$ CFU/ml trong các khoảng thời gian tương ứng. Trong môi trường BTS và AndPre không chứa kháng sinh bảo quản ở 5°C thì xu hướng này cũng lặp lại tương tự sau 24, 72 và 120 giờ bảo quản: môi trường BTS lần lượt là $0,92 \times 10^3$ CFU/ml, $0,65 \times 10^3$ CFU/ml và $0,51 \times 10^3$ CFU/ml; môi trường AndPre lần lượt là 1×10^3 CFU/ml, $0,87 \times 10^3$ CFU/ml và $0,73 \times 10^3$ CFU/ml. Kết quả xử lý thống kê sau khi logarit cơ số 10 của tổng số vi khuẩn hiếu khí cho thấy không có sự sai khác về số lượng tổng số vi sinh vật hiếu khí trong tinh dịch bảo quản trong các môi trường có kháng sinh bảo quản ở 17°C và

không kháng sinh bảo quản ở 5°C sau 24, 72 và 120 giờ (P >0,05) (Bảng 6). Do trong tinh dịch bảo quản ở 17°C có chứa kháng sinh (Gentamicine sulphate) đã hạn chế sự phát triển của vi khuẩn còn trong tinh dịch bảo quản ở 5°C nhiệt độ thấp cũng đã làm cho vi khuẩn không phát triển được. Một số nghiên cứu về bảo quản ở nhiệt độ thấp cũng cho biết bảo quản ở 5°C cũng làm hạn chế sự phát triển của vi khuẩn. Sau 72 giờ bảo quản ở 5°C, lượng vi khuẩn hiếu khí giữ nguyên hoặc giảm 2-20 lần, trong khi đó lượng vi khuẩn tăng lên gần 2 lần khi bảo quản ở 17°C (Waberski & cs., 2019a). Lượng vi khuẩn cũng có xu hướng giảm từ $2,2 \times 10^3$ CFU/ml sau 24 giờ xuống dưới 10^3 CFU/ml sau 144 giờ bảo quản trong môi trường AndroStar Premium ở 5°C (Paschoal & cs., 2020). Waberski & cs. cho biết lượng vi khuẩn tổng số cao nhất được tìm thấy trong môi trường bảo quản ở 17°C, điều này có thể được giải thích có thể do một số chủng vi khuẩn kháng kháng sinh vẫn phát triển được ở 17°C (Waberski & cs., 2019a).

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu bước đầu trên môi trường AndroStar Premium cho thấy khả năng bảo quản tinh dịch lợn trong môi trường không chứa kháng sinh ở 5°C khi chất lượng tinh dịch qua các ngày bảo quản ở 5°C không có sự sai khác với tinh dịch bảo quản ở 17°C. Đồng thời, bảo quản tinh dịch lợn ở 5°C cũng đã làm cho vi khuẩn không phát triển được. Tuy nhiên, các nghiên cứu tiếp theo cần có các thử nghiệm phối giống để so sánh tỉ lệ thụ thai cũng như năng suất sinh sản của các mẫu tinh dịch được bảo quản trong môi trường AndroStar Premium ở 5°C với các mẫu tinh dịch được bảo quản ở 17°C. Đây là cơ sở khoa học để giảm thiểu việc sử dụng kháng sinh cũng như hiện tượng kháng kháng sinh đang là thách thức với ngành chăn nuôi trong nước và thế giới.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Công ty Minitube (Tiefenbach, CHLB Đức) và Công ty

Giống Gia súc Hà Nội đã hỗ trợ để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Althouse G.C., Kuster C.E., Clark S.G. & Weisiger R.M. (2000). Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*. 53(5): 1167-76.
- Auroux M.R., Jacques L., Mathieu D. & Auer J. (1991). Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an *in vitro* study in man with *Escherichia coli*. *International Journal of Andrology*. 14(4): 264-270.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2015). TCVN 4884-1:2015 - vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - phương pháp định lượng vi sinh vật.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2011). TCVN 9111:2011 - yêu cầu kỹ thuật với lợn giống ngoại - Yêu cầu kỹ thuật.
- Bộ NN&PTNT (2017). Quyết định 2625/QĐ-BNN-TY về kế hoạch hành động quốc gia về quản lý sử dụng kháng sinh và phòng chống kháng kháng sinh trong sản xuất chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản giai đoạn 2017-2020.
- El-Mulla K.F., Köhn F.M., Dandal M., El Beheiry A.H., Schiefer H.G., Weidner W. & Schill W.B. (1996). In vitro effect of *Escherichia coli* on human sperm acrosome reaction. *Arch Androl*. 37(2): 73-8.
- Gączarzewicz D., Udała J., Piasecka M., Błaszczyk B. & Stankiewicz T. (2016). Bacterial Contamination of Boar Semen and its Relationship to Sperm Quality Preserved in Commercial Extender Containing Gentamicin Sulfate. *Pol J Vet Sci*. 19(3): 451-459.
- Hà Xuân Bộ, Đỗ Đức Lực & Đặng Vũ Bình (2011). Đánh giá phẩm chất tinh dịch lợn piétrain kháng stress nhập từ Bỉ nuôi tại xí nghiệp chăn nuôi Đồng Hiệp - Hải Phòng. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 9(5): 766-771.
- Hà Xuân Bộ, Đỗ Đức Lực, Bùi Văn Định, Bùi Hữu Đoàn, Vũ Đình Tôn & Đặng Vũ Bình (2013). Khả năng sinh trưởng và phẩm chất tinh dịch lợn đực Piétrain kháng stress nuôi tại Trung tâm giống lợn chất lượng cao - Trường đại học Nông nghiệp Hà Nội. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 11(2): 194-199.
- Jaishankar S., Murugan M. & Gopi H. (2018). SEMEN CHARACTERISTICS OF EXOTIC PIG BREEDS. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 7(2): 4.
- Jäkel H., Henning H., Luther A.M., Rohn K. & Waberski D. (2021a). Assessment of chilling

- injury in hypothermic stored boar spermatozoa by multicolor flow cytometry. *Cytometry Part A*. 10.1002/cyto.a.24301. 1-9.
- Jäkel H., Scheinpflug K., Mühldorfer K., Gianluppi R., Lucca M. S., Mellagi A. P. G., Bortolozzo F. P. & Waberski D. (2021b). In vitro performance and in vivo fertility of antibiotic-free preserved boar semen stored at 5 °C. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 12(1): 9.1-12.
- Martín L.O., Muñoz E.C., De Cupere F., Van Driessche E., Echemendia-Blanco D., Rodríguez J.M. & Beeckmans S. (2010). Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Anim Reprod Sci*. 120(1-4): 95-104.
- Menezes T.d.A., Mellagi A.P.G., Da Silva Oliveira G., Bernardi M.L., Wentz I., Ulguim R.d.R. & Bortolozzo F.P. (2020). Antibiotic-free extended boar semen preserved under low temperature maintains acceptable in-vitro sperm quality and reduces bacterial load. *Theriogenology*. 149: 131-138.
- Nesci S., Spinaci M., Galeati G., Nerozzi C., Pagliarani A., Algieri C., Tamanini C. & Bucci D. (2020). Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism. *Theriogenology*. 144: 82-88.
- Nguyen Q.T., Wallner U., Schmicke M., Waberski D. & Henning H. (2016). Energy metabolic state in hypothermically stored boar spermatozoa using a revised protocol for efficient ATP extraction. *Biology Open*. 10.1242/bio.017954.
- Paschoal A.F.L., Luther A.M., Jäkel H., Scheinpflug K., Mühldorfer K., P Bortolozzo F. & Waberski D. (2020). Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5°C. *PLoS One*. 15(6): e0234339-e0234339.
- Paulenz H., Grevle I., Tverdal A., Hofmo P. & Berg K.A. (1995). Precision of the Coulter® Counter for Routine Assessment of Boar-sperm Concentration in Comparison with the Haemocytometer and Spectrophotometer. *Reproduction in Domestic Animals*. 30(3): 107-111.
- Payne B.J., Clark S. & Maddox C. (2008). *Achromobacter xylosoxidans* in extended semen causes reproductive failure in artificially inseminated sows and gilts. *Journal of Swine Health and Production*. 16(6): 316-322.
- Riesenbeck A. (2011). Review on international trade with boar semen. *Reprod Domest Anim*. 46 Suppl 2: 1-3.
- Schmid S., Henning H., Oldenhof H., Wolkers W.F., Petrunkina A.M. & Waberski D. (2013a). The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermically stored boar spermatozoa. *Andrology*. 1(3): 376-86.
- Schmid S., Henning H., Petrunkina A. M., Weitze K.F. & Waberski D. (2013b). Response to capacitating stimuli indicates extender-related differences in boar sperm function. *J Anim Sci*. 91(10): 5018-25.
- Schulze M., Ammon C., Rüdiger K., Jung M. & Grobbel M. (2015). Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*. 83(3): 430-7.
- Schulze M., Grobbel M., Riesenbeck A., Brüning S., Schaefer J., Jung M. & Grossfeld R. (2017). Dose rates of antimicrobial substances in boar semen preservation—time to establish new protocols. *Reproduction in Domestic Animals*. 52(3): 397-402.
- Schulze M., Schäfer J., Simmet C., Jung M. & Gabler C. (2018). Detection and characterization of *Lactobacillus* spp. in the porcine seminal plasma and their influence on boar semen quality. *PLoS One*. 13(9): e0202699.
- Sepúlveda L., Bussalleu E., Yeste M. & Bonet S. (2014). Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Anim Reprod Sci*. 150(3-4): 96-106.
- Speck S., Courtiol A., Junkes C., Dathe M., Müller K. & Schulze M. (2014). Cationic synthetic peptides: assessment of their antimicrobial potency in liquid preserved boar semen. *PLoS One*. 9(8): e105949-e105949.
- Ubeda J.L., Ausejo R., Dahmani Y., Falceto M.V., Usan A., Malo C. & Perez-Martinez F.C. (2013). Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology*. 80(6): 565-70.
- Waberski D., Luther A.M., Grünther B., Jäkel H., Henning H., Vogel C., Peralta W. & Weitze K.F. (2019a). Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. *Scientific Reports*. 9(1): 14748.
- Waberski D., Riesenbeck A., Schulze M., Weitze K.F. & Johnson L. (2019b). Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*. 137: 2-7.
- Wolff H., Panhans A., Stolz W. & Meurer M. (1993). Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. *Fertil Steril*. 60(1): 154-8.
- Yeste M. (2015). Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and Current Perspectives. *Reprod Domest Anim*. 50(Suppl 2): 71-9.