تأثير أضافة اللاكتوفيرين الى مخفف السائل المنوي للكباش العواسية في التلوث الجرثومي

زينب عادل مهدي * عبد الكريم عبد الرضا هوبي
باحث أستاذ
قسم الانتاج الحيواني – كلية الزراعة – جامعة بغداد
zinabalmoosawe@yahoo.com

المستخلص

أجريت هذه الدراسة بهدف لمعرفة تأثير اضافة بروتين اللاكتوفيرين لمخففات السائل المنوي في التلوث الجرثومي .أجريت هذه الدراسة في حقل الاغنام والماعز التابع لقسم الانتاج الحيواني/ كلية الزراعة / جامعة بغداد مجمع الجادرية وذلك للفترة من 21 ايلول 2015 ولغاية 24 كانون الثاني 2016. استعملت في التجربة (4) كباش عواسية بعمر(2–4 سنوات) ، وبمتوسط وزن 52 كغم وتمت عمليات جمع السائل المنوي مرتين اسبوعيا باستخدام المهبل الاصطناعي . قسمت معاملات التجربة الى اربع معاملات المعاملة الاولى معاملة (القياس) التي اضيف لها المضادات الحيوية الاعتيادية (100,000وحدة دولية بنسلين/ 100 مل$^{-1}$) و (100 ملغم ستربتومايسين / 100 مل$^{-1}$) الى مخفف السائل المنوي للمعاملة الثانية (400 ملغم بروتين اللاكتوفيرين /لتر$^{-1}$) الثالثة (800 ملغم بروتين اللاكتوفيرين / لتر$^{-1}$) و الرابعة (1200 ملغم بروتين اللاكتوفيرين /لتر$^{-1}$) الى مخففات السائل المنوي . حفظت عينات السائل المنوي بعد التخفيف لمدة 5 ايامو على درجة حرارة 5 مْ أجريت الفحوص الفيزيائية للسائل المنوي والتي شملت سلامة اكروسوم النطف والفحوصات البكترولوجية والتي شملت الكشف عن الانواع الجرثومية والعدد الجرثومي في المعاملات الاربعة . أظهرت النتائج عدم وجود تاثير معنوي في سلامة الاكروسوم لنطف الكباش وذلك عند الحفظ بالتبريد للايام المختلفة. أدت نتائج المعاملات التي اضيف فيها اللاكتوفيرين كمضاد حيوي الى القضاء على اغلب انواع الجرثوميا مقارنة بمعاملة القياس اذ كانت انواع الجراثيم في المعاملة الاولى هي Sphingomonas و Stenotrophomonas والمعاملة الثانية والثالثة Proteus ، Klebsiella و Cupriavidus. اما معاملة القياس فقد كانت الانواع، Staphylococcus ، Salmonella Enterobacter ، Staphylococcus ، Escherichia Klebsiella . اوضحت نتائج الدراسة أن استخدام اللاكتوفيرين كمضاد حيوي أدى الى التقليل من العدد الجرثومي في المعاملات مقارنة بمجموعة القياس ، وتفوقت المعاملة الثانية 800 ملغم بروتين اللاكتوفيرين / لتر على بقية المعاملات في التقليل من العدد الجرثومي مقارنة ببقية المعاملات التي استخدم فيها ايضا اللاكتوفيرين.

كلمات مفتاحية: اللاكتوفيرين ، المضادات الحيوية، تلوث السائل المنوي.

* البحث مستل من رسالة ماجستير لمباحث الاول.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 47(6):1461-1467, 2016 Mahdi & Houbi

EFFECT OF LACTOFERRIN ADDTION TO SEMEN OF AWASSI RAMS ON THE BACTERIAL CONTAMINATION

Z.A. Mahdi A. A. Houbi
Researcher Prof.
Dep .of Animal Production - Coll. of Agric., Univ .of Baghdad
zinabalmoosawe@yahoo.com

ABSTRACT

This study was conducted at the farm of Animal production, College of Agriculture, University of Baghdad, Algaderia to know the effect of lactoferrin protein addition in the semen extender of Awassi during the period from 21 September 2015 to 24 February 2016 on Four Awasi rams aged 2-4 years and the average weight was 52 kg were used in this study . Semen collection from rams was done twice weekly by using the artificial vagina then it's were pooled and divided in to four treated groups, the control (normal antibiotic Streptomycin 100 mg\100ml Penicillin 100.000 IU / 100ml) , second ,third and fourth treated groups was used a lactoferrin protein with the contamination of 400 , 800 and 1200 mg \ L^{-1}, respectively .After dilution the semen samples have been kept at the refrigerator (5 C) for 5 days to measure some physical properties of sperm which included the acrosome integrity and some bacteriological examination (type and number) .Data obtained from this experiment showed that there was no significant difference (p≥0.05) in the acrosome integrity of sperm between the control and treated groups (2,3 and 4) which were decrease the most types of bacteria in the semen samples , where as the type of bacteria in group 2 were *sphingomonas and Stenotrophomonas* and in groups 3 and 4 were Klebsiella, Proteus, Cupriavidus, while there were six types of bacteria in the control group (Escherichia, *Klebsiella, Staphylococcus, Salmonella, Enterobacter* , and *Staphylococcus epidermidis*) . It was concluded that the use of lactoferrin in the semen causing adecrease in the total number of bacteria in the semen.

Key words : lactoferrin ,antibatic Bacteriospermia..

***Part of M.Sc. thesis of the first author.**

المقدمة

يتعرض السائل المنوي للذكور لحالات التلوث الجرثومي بشكل كبير، اذ تتميز العملية بمجموعة خطوات تختلف الواحدة عن الاخرى والمتمثلة بعملية الجمع والتخفيف والتقييم والتبريد وكذلك التعبئة والتجميد و ذلك سوف تؤدي الى وجود عوامل التلوث الجرثومي التي من شأنها التقليل من جودة السائل المنوي (1). من المعلوم أن عملية الجمع تتم في الغالب باستخدام المهبل الاصطناعي الذي يكون غير محكم الاغلاق وبالتالي فأن امكأنية التلوث واردة وبشكل كبير كما في عمليات الجمع التي تتم في الكباش وأيضا نظافة معدات الجمع ومكأن الجمع والشخص القائم بهذه العلمية لها دور مهم جدا في التلوث الحاصل عند اجراء عملية الجمع والذي يعتبر ذات دور سلبي في جودة السائل المنوي المستخدم في عمليات التلقيح الاصطناعي (21 و 13). لذلك يجب التعامل بحذر عند اجراء عملية جمع السائل المنوي واتباع الشروط اللازمة للتقليل من التلوث الحاصل في اثناء اجراء هذه العملية للتقليل قدر الامكأن من حدوث التلوث باتباع الاجراءات الصحيحة المتعلقة بهذا الجأنب والتي تبدأ من نظافة الحيوان نفسه ونظافة المنطقة حول القضيب وقص الشعر حول هذه المنطقة الذي يعد بؤرة للجراثيم وغيرها من الاحياء المجهرية فضلا عن نظافة معدات الجمع وتعقيمها باستمرار (21).(27) ان اضافة المضادات الحيوية في مخففات السائل المنوي عملت على السيطرة على الجرثوميا الموجودة والحد من عددها ونمو المستعمرات الجرثومية Forming Units (CFU) Colony والتي تؤثر بصورة مباشرة على نوعية السائل المنوي المحفوظ والتي قد تكون المسبب في حدوث انتقال للحالات المرضية.ان خلو السائل المنوي من الملوثات والمسببات المرضية او السيطرة عليها تعتبر من الشروط المهمة والواجب توفرها في السائل المنوي والمخفف المعد للتلقيح الاصطناعي لما لهذه العملية من اهمية في السيطرة على الامراض الانتقالية بين الحيوانات والاحتفاظ بخصوبة جيدة للسائل المنوي، وهذا ماتوصي به منظمة الصحة الحيوانية (17) وهوادراج استخدام المضادات الحيوية في مخففات السائل المنوي عند الحفظ بالتبريد اوالتجميد للسائل المنوي من اجل السيطرة على التلوث الجرثومي(24). ان بروتين اللاكتوفيرين من البروتنات المهمة التي تنتمي الى بروتينات عائلة الترانسفيرين الذي كان اول اكتشاف له عام 1939 م (22) . وحدثت اول عملية تنقية لهذا البروتنين عام 1960 م من الحليب البقري والحليب البشري (11 و13) . ولهذا البروتين وظائف مهمة في الجانب الدفاعي وأن اضافة بروتين اللاكتوفيرين مضادا حيويا في مخففات السائل المنوي للتقليل الى الحد الادنى من التلوث الجرثومي لما له من اهمية كبيرة في الدور المناعي ضد المسببات المرضية (7 و 10 و 6 و14). لذلك فقد صممت هذه الدراسة لمعرفة امكانية احلال بروتين اللاكتوفيرين كمضاد حيوي في مخففات السائل المنوي للكباش العواسي كبديل للمضادات الحيوية المعتادة وتاثيره على حيوية النطف.

المواد وطرائق العمل

جمع وتخفيف وتجميد السائل المنوي: اجريت هذه الدراسة في الحقل الحيواني و مختبر فسلجة تناسل الحيوان التابعين لقسم الانتاج الحيواني / كلية الزراعة جامعة بغداد / مجمع الجادرية . للفترة من 21 أيلول 2015 وحتى 24 كانون الثاني 2016. تم اجراء عملية جمع السائل المنوي من 4 كباش عواسي محلية بواسطة المهبل الاصطناعي وبواقع مرتين في الاسبوع . ثم مزج العينات (Pooled Semen) وتخفيفه بنسبة 10:1تم تحضير مخفف الترس حسب طريقة Salamon و Maxwell (21) قسمت معاملات التجربة الى اربع معاملات المعاملة (القياس) التي اضيف لها المضادات الحيوية (100,000وحدة دولية بنسلين/ 100مل) و(100 ملغم ستربتومايسين / 100 مل) الى مخفف السائل المنوي للمعاملة الثانية (400 ملغم بروتين اللاكتوفيرين /لتر)، الثالثة (800 ملغم بروتين اللاكتوفيرين / لتر) والرابعة (1200 ملغم بروتين اللاكتوفيرين /لتر) الى مخففات السائل المنوي.

صفات السائل المنوي التي تم دراستها :

فحص سلامة قلنسوة النطف: تم في هذا الاختبار التاكد من سلامة الاكروسوم للنطف وذلك باستخدام صبغة الكمزا الجاهزة (Giemsa stain) حسب طريقة (12) Hancock أما طريقة التمييز فكانت من خلال تلون غطاء رأس النطفة السليم باللون المائل للبنفسجي بينما المتضر يبقى ابيض

والمتضرر جزئيا يظهر عليه اللون الابيض في الاماكن التي حصل فيها الضرر

تحضير الاوساط الزرعية لغرض اجراء الفحوص الجرثومية

MacConkey Agar: هو الوسط المستخدم لزراعة البكتريا من السائل المنوي ويحضر الوسط من اذابة (51.5 غم) في لتر ماء مقطر في دورق خاص ومن ثم يتعرض للتعقيم على 120 مْ لمدة ربع ساعة وبعدها يصب في اطباق ابلاستيكية بعد ان يبرد لدرجة حرارة 40 مْ ز

Blood Agar : وهو من الاوساط التي استعملت في التجربة لغرض الزرع البكتيري من السائل المنوي ويحضر من اذابة (25 غم) في لتر ماء مع اضافة 5% دم وايضا يتعرض للتعقيم في جهاز التعقييم (Autoclave) وكذلك بعد وصول الوسط الى 40 مْ ويصب في الاطباق البلاستيكية أما طريقة العمل : فيتم عمل مسحة من السائل المنوي بعد التخفيف بالماسحة القطنية (disposal swab) المستخدمة لمرة واحدة ويتلف بعد الاستعمال، وعند الانتهاء من عمل المسحة على الطبق يتم حضن الطبق لمدة 24 ساعة في الحاضنة ،وبعد انتهاء 24 ساعة يظهر النمو الجرثومي على الوسط في الطبق. وبعد ذلك يتم عزل المستعمرات الجرثومية من الطبق واعادة زراعتها بشكل مفرد اي كل مستعمرة على حدى (sub culture) بوساطة الـ(loop) لغرض الحصول على نوع واحد من الجرثوميا معزول تماما عن الانواع الاخرى اي اجراء عملية (isolated). بعد الانتهاء من مرحلة زرع الجرثوميا وعزلها تتم عملية تشخيص نوع الجرثوميا بجهاز (VITEK® 2: Healthcare) المستخدم لتشخيص انواع الجرثوميا بشكل دقيق، من خلال اجراء 64 تحليلا كيميائيا على العينة المراد تشخيصها ، وبذلك يعطي دقة عالية في تشخيص نوع الجرثوميا .

عملية اجراء العد الجرثومي: بعد القيام بزرع البكتيريا على اطباق بتري والتي تحتوي على وسط غذائي صلب، بسبب عدد الجراثيم الكبير جدا، يجب القيام بتخفيف تركيز العينة بطريقة متوالية وذلك لكي نصل الى تخفيف واحد على الاقل، حاوي على عدد من الجرثوميا التي يمكن عدها على الطبق. لكي نحصل على اعداد قليلة يجب تخفيف العينة مليون ضعف (10^6). أما طريقة العمل : تم تحضير سبعة أنابيب اختبار الاولى تحتوي على العينة المراد اجراء العد الجرثومي لها والتي هي (1 مل)، اما الانابيب الست الباقية وضعت في داخلها (Normal saline) محلول الملح الفسلجي بكمية 9 مل ، ومن ثم اخذت بالماصة 1 مل من العينة وتوزيعها على الانبوبة الاولى الحاوية على العينة وتوزيعها على الانبوبة الثانية وهكذا لبقية الانابيب الى ان نصل الى الانبوبة الاخيرة ، ومن ثم القيام بعملية زرع بكتيري لكل انوب من انابيب الاختبار السبعة على الوسط Nutrient agar في الاطباق المعدة مسبقا وبواقع طبقين لكل انبوبة اختبار . وبعد الانتهاء من هذه العملية يتم حضن الاطباق لمدة 24 ساعة، وبعد انتهاء فترة الحضن يتم اخراج الاطباق ومن ثم عد المستعمرات الجرثومية في الطبق الذي يحتوي على 30 الى 300 مستعمرة بكتيرية وباستخدام المعادلة الخاصة نستخرج العدد الجرثومية.

النتائج والمناقشة

لم يلاحظ وجود تاثير معنوي ($P< 0.05$) و حصول تدهور في قلنسوة النطف الكباش بتاثير اضافة اللاكتوفيرين الى مخففات السائل المنوي للكباش وعند الحفظ بالتبريد للايام المختلفة (جدول 1). اذ يتضح من جدول (1) أن النسبة المئوية قلنسوة النطف الكباش في اليوم الاول من الحفظ كانت 90.33 ± 2.12 ، 92.83 ± 0.91 ، 92.17 ± 0.48 و93.67 ± 1.11 % وفي اليوم الثاني 85.00 ± 3.09 ، 88.17 ± 1.76 ، 89.00 ± 1.03 و89.17 ± 0.54 % وفي اليوم الثالث 83.00 ± 3.82 ، 82.50 ± 1.12 ، 82.16 ± 2.35 و 85.67 ± 1.20 % وفي اليوم الرابع 83.33 ± 4.41 ، 81.00 ± 3.05 ، 72.67 ± 11.34 و 83.20 ± 2.59 % كذلك لليوم الخامس 74.33 ± 8.08 ، 79.67 ± 4.84 ، 72.50 ± 7.77 و 79.00 ± 1.87 % للمعاملات السيطرة T1 , T2 , T3 على التوالي . أما بخصوص تاثير مدة الحفظ (اليوم) على سلامة اكروسوم النطف فقد أتضح حصول انخفاض معنوي ($P<0.01$) في قلنسوة النطف في اليوم الخامس من الحفظ لجميع المعاملات وكذلك لمجوعة السيطرة وان هذا الانخفاض لم تتجاوز نسبة عن 16 % (جدول 1) اذ بلغت النسبة المئوية قلنسوة النطف لدى مجموعة السيطرة 90.33 ± 2.12 ، 85.00 ± 3.09 ، 83.00 ± 3.82 ، 83.33 ± 4.41 و 74.33 ± 8.08 % وللمعاملة T1 92.83 ±

0.91 ، 88.17 ± 1.76 ، 82.50 ± 1.12 ، 81.00 ± 3.05 و 79.67 ± 4.84 % وللمعاملة T2 92.17 ± 0.48 ، 89.00 ± 1.03 ، 82.16 ± 2.35 ، 72.67 ± 11.34 و72.50 ± 7.77 % وللمعاملة T3 93.67 ± 1.11 ، 89.17 ± 0.54 ، 85.67 ± 1.20 ، 83.20 ± 2.59 و 79.00 ± 1.87 % للايام الاول والثاني والثالث والرابع والخامس على التوالي. وهذا مابينة الدراسة الحالية أذ لم يلاحظ اي ضرر في قلنسوة النطف في المعاملات التجريبية التي استخدم فيها اللاكتوفيرين ، ان الحاجة لوجود مواد ليست فقط للمحافظة على اكتساب الطاقة للنطف كذلك للمحافظة على قلنسوة النطف ومن ثم بقاء خلية النطفة لاطول مدة ممكنة خلال الخزن (20). ان بروتين اللاكتوفيرين المضاف للمعاملات الثلاث التجريبية اعطى حماية لقلنسوة النطف من صدمة البرد ومن ثم المحافظة على النطف في اثناء مدة التبريد وهذا مافسره (25) . كما تفسر هذه النتائج بأن المواد البروتينة تعمل على احاطة خلية النطفة ومن ثم المحافظة عليها لاطول مدة ممكنة عند الحفظ بالتبريد (15). اظهرت نتائج احلال بروتين اللاكتوفيرين مضادا حيويا بديلا عن المضادات الحيوية المستخدمة في مخففات السائل المنوي القضاء على اغلب انواع الجرثوميا الموجودة في مخففات السائل المنوي مقارنة مع معاملة السيطرة. حيث اظهرت نتائج التحليل الجرثومي للمعاملات الثلاث وجود انواع مختلفة من الجراثيم وهي كالاتي : كانت في المعاملة الاولى *sphingomonas paucimobilis* و *Stenotrophomonas maltophilia* والمعاملة الثانية Proteus mirabilis، Klebsiella pneumonia وCupriavidus pauculus وفي المعاملة الثالثة كانت : Proteus mirabilis، Klebsiella pneumonia و Cupriavidus pauculus. اما معاملة السيطرة فكانت الانواع الجرثومية فيها كالاتي *Escherichia hermannii*، *Klebsiella pneumonia Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus Salmonella cholerasuis, epidermidis* و*Enterobacter cloacae* . واظهرت النتائج وجود تفوق واضح بمستوى معنوية (P<0.01) لمعاملات التجربة الثلاث T1 ، T2 و T3. و من خلال الجدول رقم (2) كانت نتائج النسبة المئوية للانواع الجرثومية للمعاملات التجربية ومعاملة السيطرة كالاتي : المعاملة الاولى T1 2 (14.29%) والمعاملة الثانية T2 3 (21.43%) والمعاملة الثالثة T3 3 (21.43%) مقارنة مع معاملة السيطرة التي كانت 6 (42.86%) وبذلك حققت المعاملة ببروتين اللاكتوفيرين افضل النتائج. كانت قيمة مربع كاي (χ^2) 9.226 ** . (جدول 2). أظهرت نتائج المعاملة ببروتين اللاكتوفيرين كبديلا للمضادات الحيوية المستخدمة في مخففات السائل المنوي انخفاضا واضحا جدا في اعداد الجراثيم الموجودة في مخففات السائل المنوي عند الحفظ بالتبريد وبينت النتائج حدوث انخفاض واضح في اعداد الجرثوميا في المعاملات الثلاث التي استخدم فيها اللاكتوفيرين مقارنة مع معاملة السيطرة. ومن خلال الجدول (3) كانت نتائج العد الجرثومي في المعاملة الاولى T1 (8.71 ± 0.66 CUF/ml) والمعاملة الثانية T2 كانت (8.05 ± 1.15 CUF/ml) والمعاملة الثالثة كانت (9.38 ± 0.67 CUF/ml) مقارنة مع معاملة السيطرة التي كانت (11.05 ± 0.57 CUF/ml). ايضا من خلال نتائج الجدول (3) اوضحت وجود تفوق معنوي (P<0.05) للمعاملة الثانية T2 على بقية المعاملات وبذلك حققت افضل النتائج في التقليل من اعداد الجراثيم التي كانت (8.05 ± 1.15 CUF/ml) مقارنة مع معاملة السيطرة التي كانت (11.05 ± 0.57 CUF/ml). ان طبيعة وديناميكية بروتين اللاكتوفيرين الوظيفية وخاصيته الدفاعية ضد المسببات المرضية والذي يعود الى خاصية هذا البروتين في ربط الحديد واستقطابه من الاحياء الدقيقة مما يؤدي الى تلف غشاء البكتريا وموتها (23).كذلك يعد اللاكتوفيرين من البروتينات المضادة لنشاط الميكروبات والبكتريا (19). وهذا ما اظهرتة نتائج الدراسة الحالية أذ بينت النتائج ان استخدام بروتين اللاكتوفيرين كمضادا حيويا في مخففات السائل المنوي في المعاملات التجريبية فعاليته في القضاء على انواع البكتريا الموجودة في مخففات السائل المنوي في معاملة السيطرة ، اذ ان التراكيز المستخدمة من اللاكتوفيرين في المعاملات الثلاثة اسهمت بالقضاء على الانواع الضارة من البكتريا والتي من اهمها بكتيريا *E. coli* ويمكن تفسير هذه النتائج ان اللاكتوفيرين يعمل على تدمير المواقع الفعالة في البكتريا من خلال اليه عزل الحديد وكذلك التفاعل المباشر مع سطح الخلية الجرثومية وبالتالي القضاء عليها

(21)،(22)، (23)و(24). واظهرت المعاملة الثانية (mg /l 800 لاكتوفيرين) القضاء على انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام هذا ما بينه (24) أذ بين ان بروتين اللاكتوفيرين اسهم في الحد من انتشار والتصاق البكتريا عن طريق التفاعل مع غشاء الخلية الجرثومية الخارجي ومن ثم الاخلال بوظيفة الغشاء الخارجي وموت الخلية تدريجيا، وهذا مااوضحته نتائج المعاملات الثلاثة التي استخدم فيها بروتين اللاكتوفيرين كمضادا حيويا بالتراكيز الثلاثة ، كذلك قد تفسر هذه النتائج بأن اللاكتوفيرين يعمل على اخراج طبقة phosphatidylserine (LPS) التي يتكون منها غشاء الخلية الجرثومية وبذلك يغير من نفاذية غشاء الخلية والاخلال بوظيفة الغشاء في دخول وخروج المواد عبر غشاء الخلية (24) . اظهرت الدراسة الحالية ان استخدام اللاكتوفيرين كمضادا حيويا أسهم وبشكل كبير في القضاء على اغلب انواع البكتريا الضارة والتي من اهمها البكتريا السالبة لصبغة كرام وهي الـ *E. coli* التي تمتلك منافذ على سطحها الخارجي لدخول وتبادل المواد الغذائية بين الخلية الجرثومية والمحيط الخارجي وبذلك يعمل اللاكتوفيرين على التفاعل مع هذه المنافذ وغلقها وبالتالي الاخلال بوظيفة دخول وخروج المواد عبر غشاء الخلية وبالتالي موتها (9). كما ان للتراكيز المستخدمة في معاملات التجربة كان لها تاثيرا مهما في التقليل من عدد البكتريا وهذا مابينته النتائج الحالية للدراسة في التقليل قدر الامكان من العدد الجرثومي للمعاملات مقارنة مع معاملة السيطرة هذا مافسره (26) كون ان التراكيز العالية من اللاكتوفيرين لها دور كبير في القضاء على البكتريا والتاثير على فعاليتها ومن ثم موت البكتريا . كما يعمل اللاكتوفيرين على التفاعل الكهربائي مع سطح الخلية الجرثومية نتيجة وجود المواد المختلفة بتركيبة البروتين وبهذا سوف يحدث موت للخلايا ومن ثم التقليل من اعدادها (18) .وقد استنتج من الدراسة ان اضافة اللاكتوفيرين حسن من نوعية السائل المنوي للكباش وساعد على القضاء على الجراثيم الضارة في السائل المنوي.

جدول 1. تأثير المعاملة باللاكتوفيرين والوقت بعد التخفيف في النسبة المئوية في سلامة قلنسوة النطف (المتوسط ± الخطأ القياسي)

المعاملة	اليوم بعد الجمع					مستوى المعنوية
	الاول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس	
السيطرة	2.12 ± 90.33 A a	3.09 ± 85.00 A ab	3.82 ± 83.00 A ab	4.41 ± 83.33 A ab	8.08 ± 74.33 A b	**
T1	0.91 ± 92.83 A a	1.76 ± 88.17 A ab	1.12 ± 82.50 A bc	3.05 ± 81.00 A c	4.84 ± 79.67 A c	**
T2	0.48 ± 92.17 A a	1.03 ± 89.00 A a	2.35 ± 82.16 A ab	11.34 ± 72.67 A b	7.77 ± 72.50 A b	**
T3	1.11 ± 93.67 A a	0.54 ± 89.17 A b	1.20 ± 85.67 A bc	2.59 ± 83.20 A cd	1.87 ± 79.00 A d	**
مستوى المعنوية	NS	NS	NS	NS	NS	---

المتوسطات التي تحمل حروفا كبيرة ضمن العمود الواحد (بين المعاملات) وحروفا صغيرة ضمن الصف الوحد (بين الايام) تختلف معنويا فيما بينها.
** (P<0.01)، NS: غير معنوي.

جدول 2 العدد والنسبة المئوية لانواع البكتريا في المعاملات التجريبة المستخدم فيها اللاكتوفيرين ومعاملة السيطرة.

المعاملة	نوع الجرثوميا	العدد (%)
المعاملة الاولى T1 LF 400 mg /L	*sphingomonas paucimobilis* *Stenotrophomonas maltophilia*	2 (%14.29)
المعاملة الثانية T2 LF 800 mg/L	*Klebsiella pneumonia* *Proteus mirabilis* *Cupriavidus pauculus*	3 (%21.43)
المعاملة الثالثة T3 LF 1200 mg /L	*Klebsiella pneumonia* *Proteus mirabilis* *Cupriavidus pauculus*	3 (%21.43)
Control	*Escherichia hermannii* *Klebsiella pneumoniae* *Staphylococcus aureus* *Salmonella cholerasuis* *Enterobacter cloacae* *Staphylococcus epidermidis*	6 (%42.86)
العدد الكلي	----	14 (%100)
قيمة مربع كاي (χ^2)	----	** 9.226

.(P<0.01) **

جدول 3 . تأثير المعاملة باللاكتوفيرين في مخففات السائل المنوي على العدد الجرثومي

المعاملة	المتوسط ± الخطأ القياسي (CUF/ml)
السيطرة (Control)	a 0.57 ± 11.05
المعاملة الاولى T1 LF 400 mg /ml	ab 0.66 ± 8.71
المعاملة الثانية T2 LF 800 mg/ml	b 1.15 ± 8.05
المعاملة الثالثة T3 LF 1200 mg /ml	ab 0.67 ± 9.38
مستوى المعنوية	*

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها.
* (P<0.05).

REFERENCCES

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

2.Althouse, G. C. 2008 Sanitary procedures for the production of extended semen. Reprod. Domest. Anim. , 43, 374–378.

3.Arnold, R. R., J. E. Russell, W. J. Champion and J. J. Gauthier. 1981. Bactericidal activity of human lactoferrin: Influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. Infect. Immun. 32:655-660.

4.Arnold, R. R., J. E. Russell, W. J. Champion, M. Brewer and J. J. Gauthier. 1982. Bactericidal activity of human lactoferrin: Differentiation from the stasis of iron deprivation. Infect. Immun. 35:792-799.

5.Arnold, R. R., M. Brewer and J. J. Gauthier. 1980. Bactericidal activity of human lactoferrin: Sensitivity of a variety of microorganisms. Infect. Immun. 28:893-898.

6.Baker, E. N. and H. M. Baker. 2005. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. Cell Mol. Life Sci. 62(22):2592-30.

7.Brock, J.H.2002. The physiology of lactoferrin. Biochem. Cell Biol. 80:1-6.

8.Ellison, R. T.,3rd, T. J. Giehl and F. M. LaForce. 1988. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infect. Immun. 56:2774-2781.

9.Erdei, J., A. Forsgren and A. S. Naidu. 1994. Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in Escherichia coli. Infect. Immun. 62:1236-1240.

10.Farnaud, S. and R. W. Evans. 2003.Lactoferrinamultifunctional protein with antimicrobial properties. Mol. Immunol. 40:395-405.

11.Groves, M. L. 1965. Preparation of some iron-binding proteins and alpha-lactalbumin from bovine milk. Biochom. Biophys. Acta. 100:154-162.

12.Hancock, J.L.1946. Morphology of bull spermatozoa. Nature.157:447- 454.

13.Johanson, B. 1960. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. Acta Chem. Scand. 14:510512.doi:10.3891/ acta. chem. scand.14-0510.

14.Legrand, D., A. Pierce, E. Elass, M. Carpentier, C. Mariller and J. Mazurier. 2008. Lactoferrin structure and functions. Adv. Exp. Med. Biol. 606:163-194.

15.Mann.T.1974.Ostatnieosiagniecia naukowe w dziedzinie biochemii nasieniaiukladur-ozrodczegomeskiego.Zesz.Nauk.AR Krakow.

16.Maxwell, W. M. C.and Salamon, S., 1993. Liquid storage of ram semen—a review. Reprod. Fertil. Dev. 5, 613–638.

17.OIE. 2008. World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th Ed.

18.Oo, T. Z., N. Cole, L. Garthwaite, M. D. Willcox and H. Zhu. 2010. Evaluation of synergistic activity of bovine lactoferricin with antibiotics in corneal infection. J. Antimicrob. Chemother.

19.Pierce, A. and D. Legrand. 2009. Advances in lactoferrin research. Biochimie. 91:1-2.

20. Russell LD, Montag B, Hunt W, and Peterson RN. 1985. Properties of boar sperm plasma membranes (PM): proteins released by washing and differential solubility in salts, detergents, and sensitivity to surface radiolabelling. Gamete Res; 11:237–252.

21.Salamon, S., and Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 62, 77–111.

22.Sorensen, M. and S. P. L. Sorensen. 1939. The proteins in whey. C.R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim. 23:55.

23.Suzuki, Y. A., V. Lopez and B. Lonnerdal. 2005. Mammalian lactoferrin receptors:

Structure and function. Cell Mol. Life Sci. 62(22):2560-75.

24.Thibier, M., and Guerin, B., 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. Anim. Reprod. Sci. 62, 233–251.

25.Watson, P.F and Anderson, W.J.1983. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cod shock. J. Reprod. Fertile, 69(1):229-235.

26.Weinberg,E.D.2004. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. Med. Hypotheses. 63:863-865.

27.Yaniz, J. L., Marco-Aguado, M. A., Mateos, J. A.and Santolaria P. 2010. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. Anim. Reprod. Sci., (122): 142-149.