

WITOLD ZIELIŃSKI, JERZY MORSTIN, ANDRZEJ PIETRASZEK

# Rozcieńczalnik o przedłużonej ważności do konserwacji nasienia buhajów

Z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębku

Na przestrzeni ostatnich lat, skład i technologia sporządzania rozcieńczalników do nasienia buhajów przechodzi stałą ewolucję (1, 2).

W wielu krajach, niezależnie od rozcieńczalników sporządzanych według określonych receptur przez laboratoria zakładów unasienniania, produkowane są również rozcieńczalniki gotowe (2). Jednak większość znajdujących się w handlu „gotowych” rozcieńczalników wymaga przed bezpośrednim użyciem dodatkowych zabiegów laboratoryjnych (dodatku glicerolu, żółtka jaja kurzego względnie wody destylowanej).

W Polsce zakłady unasienniania, przy technice konserwacji nasienia w niskich temperaturach, stosują rozcieńczalnik żółtkowo-cytrynianowo - fruktozowo - glicerynowy (żcfglic.). Ze względu na skład, rozcieńczalnik ten ma krótki okres ważności, gdyż tylko około jednej doby. Z tego powodu laboratoria zakładowe muszą przygotowywać go w każdym dniu pobierania nasienia. Pozostałości nie wykorzystane ulegają zniszczeniu. Podjęcie zatem produkcji rozcieńczalników gotowych miałoby praktyczne i ekonomiczne uzasadnienie. Kierując się tymi przesłankami podjęto w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębku badania, zmierzające do uzyskania gotowego rozcieńczalnika o trwałości co najmniej 2—3 miesięcy.

## Materiał i metody

Badania własne skoncentrowano na rozcieńczalniku żółtkowo - cytrynianowo - fruktozowo - glicerynowym (żcfglic.), który jest zalecany i powszechnie stosowany w Polsce w praktyce unasienniania krów nasieniem mrożonym (5). W skład tego rozcieńczalnika — w przeliczeniu na 100 ml — wchodzi następujące komponenty:

— roztwór 2,9% dwuwodnego cytrynianu sodowego	— 72,00 ml
— żółtko jaja kurzego	— 20,00 ml
— gliceryna	— 8,00 ml

oraz

— fruktoza	— 0,10 g
— streptomycyna	— 0,10 g
— penicylina	— 1000 000 j.m.

Drugi wariant tego rozcieńczalnika, poza wymienionymi komponentami, zawierał dodatek Tweenu 85\*) w ilości 0,05%.

Wszystkie komponenty poddawano procesowi dokładnego mieszania w mikserze. Przygotowane w ten sposób rozcieńczalniki rozdzielano do szklanych flakonów tzw. plazmówek o poj. 250 ml, zamykano gumowymi korkami i nakręcano metalowe kapsle.

Utrwalanie rozcieńczalników przeprowadzano metodą pasteryzacji lub przy pomocy tlenu etylenu. Stosowano tzw. pasteryzację niską (temperatura 63—65°C, czas 30 minut). Po upływie doby połowę flakonów poddawano ponownie pasteryzacji stosując te same parametry temperatury i czasu.

W drugim przypadku rozcieńczalnik wyjaławiano tlenkiem etylenu, wprowadzając go w ilości około 5 ml na dno flakonu z rozcieńczalnikami. Flakony zakrywano korkami z waty, a po 24 godzinach przetrzymywania ich w temperaturze pokojowej, celem odparowania tlenu etylenu, zamykano jałowymi korkami gumowymi nad palnikiem gazowym.

Ocenę rozcieńczalników oparto o badania mikroskopowe jakości tych samych ejakulatów, podzielonych na odpowiednią ilość części. Wyniki, tj. wskaźnik ruchliwości plemników w nasieniu świeżym, jak i po zamrożeniu w ciekłym azocie, określano pod mikroskopem optycznym. Jako układ odniesienia przyjęto analogiczny wynik uzyskany przy użyciu rozciezczalnika sporządzonego w dniu badania według receptury Państwowych Zakładów Unasienniania Zwierząt (5).

Badania ważności (trwałości) rozciezczalników, przechowywanych w zaciemnieniu i temperaturze pokojowej, przeprowadzano co 30 dni w czasie 3 miesięcy, używając każdorazowo do ich oceny świeżo pobranych ejakulatów, które poddawano mrożeniu w ciekłym azocie.

Badania mikrobiologiczne rozciezczalników przeprowadzano po ich sporządzeniu, tj. po upływie około 1 godz. oraz po zabiegach utrwalających, oznaczając:

— ogólną liczbę bakterii (3),
— miano coli (4).

Tab. 1. Wyniki mikrobiologicznych badań rozciezczalników

Rozciezczalnik	Ogólna liczba bakterii od - do	Miano bakterii <i>E.coli</i>
Świeży, bezpośrednio po wykonaniu, przed zabiegami pasteryzacji	$10^3 - 13 \times 10^3$	$10^{-2}$
Świeży, bezpośrednio po dodaniu antybiotyków	$0,5 \times 10^3 - 0,5 \times 10^4$	$10^{-2}$
Po niskiej pasteryzacji jednokrotnej	0	0
Po niskiej pasteryzacji dwukrotnej	0	0
Wyjaławianie tlenkiem etylenu	W niektórych flakonach nie stwierdzono obecności bakterii, w innych do 1000 komórek w 1 ml rozciezczalnika	

\*) Ester kwasu olejowego z trójeterem sześciooksyetylenowym sorbitanu — czynnik aktywny powierzchniowo — biopolarny emulgator niejonowy.

Tab. 2. Wyniki oceny ruchliwości plemników (wg norm dla PZUZ) 24 ejakulatów od 4 buhajów przy użyciu badanych rozcieńczalników

Rozcieńczalnik	Wskaźnik ruchliwości plemników (ruch postępowy)						
	nasienie świeże				nasienie mrożone		
	zdyskwalifikowane	około 60%	60-80%	powyżej 80%	zdyskwalifikowane	30-40%	powyżej 40%
Kontrolny (świeży)	0	6	17	1	5	19	0
Pasteryzowany jednokrotnie: z Tweenem	0	4	18	2	3	20	1
bez Tweenu	0	5	18	1	5	19	0
Pasteryzowany dwukrotnie: z Tweenem	0	3	18	3	2	20	2
bez Tweenu	0	6	17	1	4	19	1
Wyjaławiany tlenkiem etylenu	24	0	0	0	nie badano		

Wyniki i omówienie

Rozcieńczalniki sporządzone w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, w warunkach laboratoryjnych, posiadały dość bogatą mikroflorę (tab. 1). Ogólna liczba bakterii w rozcieńczalnikach nie zawierających antybiotyków, wahała się w granicach 1000—1300 komórek w 1 ml. Stwierdzono w nich także obecność bakterii z grupy *E. coli*. Antybiotyki obniżały ogólną liczbę bakterii o około 50%, natomiast miano *E. coli* nie ulegało zmniejszeniu.

Rozcieńczalniki po jednorazowej pasteryzacji niskiej nie wykazywały już obecności bakterii. Zastosowanie pasteryzacji ponownej, po upływie 24 godzin oraz dodatek antybiotyków miały na celu zniszczenie flory bakteryjnej, która ewentualnie mogła się rozwinąć w międzyczasie z form przetrwalnikujących.

Tlenek etylenu wykazał różną efektywność, zapewne z uwagi na trudności stosowania tej substancji (punkt wrzenia 10—14°C). Niektóre flakony wyjaławiane tą metodą nie wykazywały obecności bakterii, podczas gdy w innych rozcieńczalnikach zawierały do kilkuset komórek w 1 ml.

W tab. 2 zestawiono wyniki serii badań, przeprowadzonych na 24 ejakulatach odpowiadających wymaganiom zawartym w Instrukcji prac laboratoryjnych dla PZUZ\*\*) (5) przy użyciu wszystkich wariantów rozcieńczalnika.

Rozcieńczalniki wyjaławione tlenkiem etylenu z reguły powodowały szok plemników i zostały wyeliminowane z dalszych badań. Pozostałe wersje rozcień-

czalników nie pogorszyły ruchliwości plemników i to zarówno przy badaniu nasienia świeżego jak i po zamrożeniu w ciekłym azocie. Można nawet zauważyć pewną tendencję na korzyść rozcieńczalników pasteryzowanych, zawierających dodatek Tweenu 80. Tendencja ta przejawia się także w przypadku zastosowania rozcieńczalnika dwukrotnie pasteryzowanego z dodatkiem Tweenu 80, przy badaniu nasienia po zamrożeniu. Podobne zależności zaobserwowano przy okresowych badaniach nasienia zamrożonego w rozcieńczalnikach doświadczalnych sporządzonych przed 30, 60 i 90 dniami (tab. 3). Uzyskane wyniki wskazują, że rozcieńczalniki pasteryzowane nie pogarszają swej jakości na przestrzeni pełnych trzech miesięcy.

Wykazana tendencja nieco wyższej ruchliwości plemników przy badaniu ejakulatów w rozcieńczalnikach pasteryzowanych może być związana z ewentualnymi zmianami w strukturze białek żółtka jaja kurzego, bądź pod wpływem Tweenu, który zapewnia większą jednorodność płynu w czasie jego przechowywania.

Wnioski

1. Rozcieńczalniki żółtkowo - cytrynianowo-fruktuzowo - glicerynowe (żfcglic) z dodatkiem antybiotyków poddane jedno- lub dwukrotnej niskiej pasteryzacji nie wykazują obecności bakterii, a użyte do konserwacji nasienia buhajów dają analogiczne wskaźniki ruchliwości

Tab. 3. Wyniki okresowych badań jakości rozcieńczalników na podstawie wskaźnika ruchliwości plemników tych samych ejakulatów

Rozcieńczalnik	Liczba badanych ejakulatów	Ocena <sup>**)</sup> ruchliwości plemników	Nasienie rozcieńczone rozcieńczalnikiem sporządzonym przed:					
			30 dniami		60 dniami		90 dniami	
			świeże	mrożone	świeże	mrożone	świeże	mrożone
Kontrolny *)	4	-	0	0	1	1	0	0
		+	3	4	3	3	3	4
		#	1	0	0	0	1	0
Pasteryzacja jednokrotna z Tweenem	4	-	0	0	1	1	0	0
		+	3	3	3	3	2	4
		#	1	1	0	0	2	0
Pasteryzacja jednokrotna bez Tweenu	4	-	0	0	1	1	0	0
		+	3	4	3	3	3	4
		#	1	0	0	0	1	0
Pasteryzacja dwukrotna z Tweenem	4	-	0	0	1	1	0	0
		+	3	3	2	2	2	3
		#	1	1	1	1	2	1
Pasteryzacja dwukrotna bez Tweenu	4	-	0	0	1	1	0	0
		+	4	4	3	3	3	4
		#	0	0	0	0	1	0

Objaśnienia: \*) = rozcieńczalnik kontrolny sporządzony wg Instrukcji prac laboratoryjnych dla PZUZ w dniu badania; \*\*) = system oceny: (-) poniżej 60% plemników o ruchu prawidłowym w nasieniu świeżym lub poniżej 30% w mrożonym, (+) 60—80% plemników o ruchu prawidłowym w nasieniu świeżym lub 30—40% w nasieniu mrożonym, (++) powyżej 80% plemników o ruchu prawidłowym w nasieniu świeżym lub powyżej 40% w mrożonym.

\*\*) Co najmniej 800 000 plemników w 1 mm<sup>3</sup> ejakulatu, 80% plemników o ruchu postępowym.

plemników, co rozcieńczalniki świeże i to zarówno przed jak i po zamrożeniu w ciekłym azocie.

2. Rozcieńczalniki żółglic, po niskiej pasteryzacji z dodatkiem Tweenu 80, zachowują trwałość i jednorodność w czasie 3 miesięcy od daty wyprodukowania i przy przechowywaniu ich w temperaturze pokojowej, w zaciemnionym miejscu.

#### Piśmiennictwo

1. Bielański W.: Rozród zwierząt. PWRiL 1972.
2. Głód W.: Rozród i unasielenie bydła. PWRiL 1969.
3. Harrigan W. F., McCance M. F.: Laboratory methods in Microbiology. Acad. Press. London and New York 1968.
4. Surkiewicz B. E.: JAOAC 49, 276, 1966.
5. Wierzbowski S., Piłch J.: Nasienie mrożone w inseminacji bydła. PWRiL 1970.

Adres autora: doc. dr Witold Zieliński, ul. Marszałkowska 87 m. 33, 00-683 Warszawa.

Зелиньски В., Морстин Е., Петрашек А. — Разбавитель спермы с продленным сроком действительности при применении для консервирования семени быков.

В Институте Генетики и Животноводства Польской Академии Наук установили, что разбавитель семени состоящий из лимоннокислого натрия, желтка, фруктозы и глицерина и широко применя-

емый в Польше может быть без никаких изменений состава и без никаких добавок перед применением использован в течении 3 месяцев от изготовления при хранении также в комнатной температуре. Добавка Tween-80 гарантирует однородность разбавителя во время его хранения. Разбавители изготовленные по этой технологии, применяемые для консервирования семени быков имеют аналогические параметры подвижности сперматозоидов как свежие, в периоде до и после замораживания эякулятов в жидком азоте.

Zieliński W., Morstin J., Pietraszek A. — A diluter of prolonged validity for the preservation of bulls semen.

In the Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences at Jastrzębiec there was developed a technology to prolong the validity of a yolk-citrate-fructose-glycer diluter, usually applied in Poland for the insemination of cows with a frozen semen. The diluter is complete and does not require any additives prior to mixing with a semen. It may be stored at room temperature. The diluters produced according to this technology and used for the preservation of bulls semen give the same indices of spermatozoa motility as fresh ones. Deep freezing in liquid nitrogen does not influence the results. Laboratory investigations indicate that this diluter maintains an unchanged „validity” for three months since production, and the addition of Tween 80 secures its uniformity during its storage.

## HIGIENA I TECHNOLOGIA PRODUKCJI ZWIERZĘCEJ

MAREK DUTKIEWICZ

### Potencjalne źródła zatruc trzody chlewnej w nowoczesnej hodowli

Z Instytutu Fizjologii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR w Warszawie

Większość zatruc trzody chlewnej w warunkach hodowli masowej wynika z błędów żywieniowych, jak również z przypadkowego kontaktu zwierząt z pestycydami. Poważnym zagadnieniem, które przynosi dużo kłopotów lekarzom sprawującym opiekę nad chlewniami zarodowymi, tuczarniami trzody chlewnej i fermami o zamkniętym cyklu produkcyjnym, są zatrucia, których źródło tkwi w budynkach inwentarskich. Chociaż zatrucia spowodowane czynnikami związanymi z przebywaniem trzody chlewnej w pomieszczeniach są w ostatnim okresie stosunkowo częste, to jednak w piśmiennictwie fachowym poza sporadycznym opisem przypadków kazuistycznych brakuje szerszych opracowań tego tematu.

Jak wynika z przeglądu współczesnego piśmiennictwa źródła tych zatruc można szukać

w wielu elementach otoczenia zwierzęcego. Przyczyną masowych zatruc trzody mogą być niektóre materiały budowlane, głównie materiały używane do wykładania i uszczelniania podłóg, do impregnacji drewna, farby do ochrony konstrukcji drewnianych i metalowych. Notuje się sporadyczne przypadki zachorowań po niewłaściwym stosowaniu preparatów odkażających. Preparaty owadobójcze i gryzoniobójcze stosowane w sposób niezgodny z przepisami stanowią poważne niebezpieczeństwo dla zdrowia zwierząt. Błędne rozwiązania konstrukcyjne urządzeń kanalizacyjnych, a także awarie urządzeń klimatyzacyjnych mogą powodować zatrucia w wyniku działania na trzodę trujących gazów. Rozwój mechanizacji powoduje możliwość zetknięcia się świń z takimi truciznami jak ropa naftowa, olej silnikowy, nafta, benzyna.