

- in mixtures of yolk-citrate, yolk-glycyrn, whole milk, skim milk, and glycerol. J. Dairy Sci., 41, 524, 1958.
3. Bonnadonna T. N.: (1956). Cyt. Prachoff R. (14).
  4. Bruce W.: (1956). Cyt. Prachoff R. (14).
  5. Eibl K.: Lehrbuch der Rinderbesamung, 116. Berlin i Hamburg, 1959.
  6. Hendriksje J., Loling K. F.: De bevruchting met sperma verdund met een mengsel van ondermelk en eidoder. Tijdschr. Diergeneesk. 82, 964, 1957.
  7. Jaquet J.: Emploi de diluents a base de lait pour la conservation du sperma des taureaux, „Rep. of the II Int. Congr. of Phys. and Path. of Anim. Reprod. and of Art. Ins.“. Copenhagen 3, 111, 1952.
  8. Jaśkowski L.: Badania porównawcze nad przechowywaniem nasienia buhajów w rozcieńczalnikach: żółtkowo-cytrynianowo-glikozowym, żółtkowo-cytrynianowym i mlecznym R. N. R. 67-E-4, 409, 1956.
  9. Jaśkowski L.: Nowe badania nad konserwacją nasienia buhajów. P. T. N. W. Biuletyn 111 Sesji Sekcji Fizjologii i Patologii Rozrodu oraz Inseminacji Zwierząt. Bydgoszcz 1958. Postępy nauk rolniczych. 1, 55, 1959.
  10. Kluza J., Michalski S., Zebracka-Szczęśna Z., Schmid J.: Wyniki unasieniania bydła przy zastosowaniu rozcieńczalnika mlekowo-żółtkowego. Zeszyty Probl. Post. Nauk Rol. 11, 157, 1958.
  11. Lapland i współprac., 1951. Cyt. Prachoff R. (14).
  12. Melrose D. R., Stewart D. L., Bruce W.: Comparative fertility studies of bovine semen diluents containing powdered skim milk, fresh skim milk, glycine, and Egg yolk. Wet. Rec. 70, 433, 1958.
  13. O'Dell W. T., Almgvist J. O.: Freezing bovine semen. L. Techniques for freezing bovine spermatozoos in milk diluents J. Dairy Sci. 40, 1534, 1957.
  14. Prachoff R.: Die Milch als pufferlösung für Sperma bei künstlicher Besamung der landwirtschaftlichen Nutztiere. Zuchthygiene, Fortpflanzungsstörungen und Besamung der Haustiere. Band 2. Heft 3, 144, 1958.
  15. Szumowski, Markowicz, Cano. 1956. Cyt. za Prachoff (14).
  16. Weiga, Koeffi, Mazotti. 1953. Cyt. za Prachoff (14).
  17. Zebracka-Szczęśna Z.: Mleko krowie jako rozcieńczalnik nasienia buhaja. Zesz. Nauk WSR Kraków. Z. 1, nr 3, 115, 1957.

Adres autora: Ignacy Wiatroszak. Poznań, Al. Wielkopolska 10 m. 2.

KAZIMIERZ ROSŁANOWSKI

## Zachowanie się plemników buhaja w rozrzedzalnikach z dodatkiem glicerolu

Część II. DALSZE OBSERWACJE NAD DODATKIEM GLICEROLU DO NASIENIA BUHAJA

Z Zakładu Sztucznego Unasieniania w Poznaniu  
Laboratorium Doświadczalne

Dyrektor: mgr inż. TADEUSZ SZALAJKO

Z Katedry Zoohigieny WSR w Krakowie  
Kierownik: prof. dr WŁADYSŁAW BIELAŃSKI

W publikacji niniejszej nie przytoczono poprzednio opisanych w literaturze wyników innych autorów, ograniczając się do omówienia własnych badań.

W latach 1956—1957 przeprowadzono wstępne doświadczenie o charakterze laboratoryjnym nad dodatkiem glicerolu do nasienia buhaja (*Roslanowski* — 1957, 5). Wykazano wówczas, że wpływ glicerolu na zachowanie się plemników zależy jest od jego stężenia w rozrzedzalniku.

Ponadto stwierdzono, że w wypadku ochłodzenia nasienia do temperatury około  $-15^{\circ}\text{C}$  żywotność plemników jest tym wyższa im wyższe jest stężenie glicerolu. W wyniku tych obserwacji wykazano przydatność glicerolu w konserwacji nasienia celem zabezpieczenia plemników przed uszkodzeniem na skutek zamrażania w okresie silnych mrozów (w transporcie zimowym).

W oparciu o przytoczone wstępne obserwacje i wyniki przeprowadzono ponowne doświadczenie, w którym starano się ustalić:

1. Wartość niektórych metod dodawania glicerolu do nasienia konserwowanego w temperaturze  $+5^{\circ}\text{C}$ .

2. Jaki wpływ wywierają antybiotyki na konserwację nasienia glicerolizowanego.

### Material

Podstawowym rozrzedzalnikiem używanym w doświadczeniu był rozcieńczalnik mlekowo-żółtkowy (10 ml żółtka i 90 ml mleka pełnego). Natomiast po dodaniu glicerolu skład rozrzedzalnika był następujący: 10 ml żółtka, 10 ml glicerolu i 80 ml mleka.

Stosowany glicerol był produkcji krajowej i posiadał następujące właściwości chemiczne:

ciężar właściwy: 1,2269  
zawartość bezwodnego glicerolu: 86%  
odczyn (pH): 6,60

Użyte antybiotyki były również produkcji krajowej i stosowano je w ilościach: 100.000 j penicyliny i 0,1 g streptomycyny na 100 ml rozrzedzalnika.

Nasienie pochodziło od buhajów rasy n.c.b. będących własnością Zakładu Sztucznego Unasieniania w Poznaniu.

### Metodyka

Ad. 1. Zastosowano trzy sposoby dodawania glicerolu, a mianowicie:

1. Glicerol był dodawany do rozrzedzalnika jednorazowo (w jednej porcji) w temperaturze pokojowej (skrótowa glicerolizacja). W ten sposób przygotowanym rozrzedzalnikiem rozcieńczano nasienie zarówno wstępnie jak i ostatecznie \*).

2. Glicerol dodawano jednorazowo dopiero po ochłodzeniu nasienia rozcieńczonego do temperatury  $+5^{\circ}\text{C}$ .

3. Glicerol dodawano porcjami (3 równe objęściowo porcje w ciągu 10 minut) po ochłodzeniu nasienia rozrzedzonego do temperatury  $+5^{\circ}\text{C}$ .

Kontrolę stanowiło nasienie w rozrzedzalniku mlekowo-żółtkowym bez żadnych dodatków.

Ocenę wartości metod dodawania glicerolu oparto na wynikach przeżywalności nasienia w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  i  $46,5^{\circ}\text{C}$ . Zdolność przeżywania nasienia kontrolowano w dwóch okresach:

1. Po 18 godzinach od chwili rozrzedzenia nasienia poddawano je działaniu temperatury  $+46,5^{\circ}\text{C}$  przy czym ruchliwość plemników badano co 15 minut.

2. Po 10 dniach przechowywania nasienia w temperaturze  $+5^{\circ}\text{C}$  poddawano je działaniu temperatury

\*) W badaniach przeprowadzonych w okresie późniejszym stwierdzono, że wprowadzenie pewnych zmian w technice skrótowej glicerolizacji daje lepsze wyniki. Ulepszona technika skrótowej glicerolizacji polega na tym, że rozrzedzenie wstępne nasienia przeprowadza się rozcieńczalnikiem mlekowo-żółtkowym bez glicerolu, natomiast rozrzedzenie ostateczne dokonuje się rozcieńczalnikiem glicerolizowanym. Rozrzedzenie ostateczne przeprowadza się w temperaturze pokojowej.

+37°C. Zachowanie się plemników sprawdzano co 30 minut.

Obserwacją objęte zostały 32 ejakulatory pochodzące od 24 buhajów.

Ad. 2. Celem stwierdzenia wpływu antybiotyków na nasienie glicerolizowane badano jego przeżywalność w następujących rozrzedzalnikach:

A. Rozrzedzalnik: żółtko + mleko (10 : 90 ml) (kontrola).

B. Rozrzedzalnik: żółtko + mleko + glicerol (10:80:10 ml)

C. Rozrzedzalnik: żółtko + mleko + glicerol + penicylina (10 : 80 : 10 ml (100 000 j)

D. Rozrzedzalnik: żółtko + mleko + glicerol + streptomycyna (10 : 80 : 10 ml/0,1 g)

Glicerol dodawano do nasienia metodą skróconą. Podobnie jak przy ocenie metod dodawania glicerolu tak i w tym wypadku metoda postępowania oparta została na kontroli zdolności przeżywania nasienia w wymienionych rozrzedzalnikach.

Bezpośrednio po rozcieńczeniu nasienia badano jego przeżywalność w temperaturze 46,5°C. Następnie po 10 dniach przechowywania w temperaturze +5°C. badano jego przeżywalność w temperaturze +37°C. Obserwacją objętych zostało 30 ejakulatów pochodzących od 23 buhajów.

## Wyniki

### 1. Różnice w sposobie dodawania glicerolu.

Wyniki przedstawia zestawienie 1. i wskazuje, że najdłużej przeżywało nasienie do którego glicerol dodawano porcjami po ochłodzeniu.

Zestawienie 1.

Przeżywalność nasienia z dodatkiem glicerolu (kontrola metod dodawania glicerolu)

Ilość prób	Czas konserwacji w temp. +5°C	Temperatura przeżywania	Czas przeżywania nasienia (w minutach)			
			Kontrola	Metoda I	Metoda II	Metoda III
32	18 godz.	46,5° C	61,8	63,3	63,9	72,5
32	10 dni	37,0° C	179,5	201,0	228,5	250,7

Obliczenia statystyczne przeprowadzone metodą podwójnej wariancji wykazały, że dla przeżywalności nasienia w temperaturze 46,5°C (po 18 godzinach konserwacji) najmniejsza różnica udowodniona wynosi 4,63, zaś dla przeżywalności nasienia w temperaturze 37°C (po 10 dniach konserwacji) wynosi 31,8.

### 2. Wpływ dodatku antybiotyków na przeżywalność nasienia rozrzedzonego rozcieńczalnikiem zawierającym glicerol.

Przy porównywaniu rozcieńczalników o różnym składzie stwierdzono, że nasienie rozrzedzone rozcieńczalnikiem D (żółtko + mleko + glicerol + streptomycyna) dało najdłuższy czas przeżywania plemników (Zestawienie 2).

Obliczenia statystyczne przeprowadzone metodą poprzednio stosowaną wykazały, że najmniejsza różnica udowodniona dla wyników

Zestawienie 2.

Przeżywalność nasienia w różnych rozrzedzalnikach (ocena wpływu antybiotyków)

Ilość prób	Czas konserwacji w temp. +5°C	Temperatura przeżywania	Czas przeżywania nasienia (w minutach)			
			Roz. A	Roz. B	Roz. C	Roz. D
30	0 godz.	46,5° C	71,0	74,5	72,0	78,0
30	10 dni	37,0° C	164,5	187,5	207,0	235,0

przeżywalności nasienia w temperaturze 46,5°C wynosi 4,47, zaś dla przeżywalności w temperaturze 37°C wynosi 26,57.

## Omówienie wyników

Otrzymane wyniki przy badaniu wartości stosowanych metod dodawania glicerolu wykazują, że po 18 godzinach konserwacji nasienia jego przeżywalność w temperaturze 46,5°C jest najdłuższa przy zastosowaniu glicerolizacji według metody III., tzn. przy stopniowym dodawaniu glicerolu do nasienia ochłodzonego do temp. +5°C. Pozostałe wyniki są tak zbliżone do siebie, że nie przedstawiają statystycznie istotnych różnic.

Po 10 dniowej konserwacji w temperaturze +5°C nasienie wykazuje różną przeżywalność (badane w 37°C). Najlepsze wyniki otrzymano z nasieniem, do którego glicerol dodawano według metody III. Wyniki najbardziej zbliżone do kontroli daje nasienie poddane glicerolizacji skróconą techniką (metoda I.) Dodatek glicerolu do nasienia metodą II nie wykazał statystycznie istotnych różnic w wynikach w porównaniu z nasieniem glicerolizowanym techniką skróconą.

Warto podkreślić, że ogólnie stosowana technika dodawania glicerolu (patrz Cz. I. *Rostanowski* — 1960, 6) polega na tym, że glicerolizację przeprowadza się w temperaturze +5°C tzn. dopiero po ochłodzeniu nasienia. Stosowali ją między innymi *Sikes* i *Merilan* w 1958 r. (7), *Snyder* i *Farmer* w 1958 r. (8), oraz *Almqvist* w 1959 r. (1). Stosują ją również te Stacje A.I. w USA, które prowadzą konserwację nasienia w rozrzedzalnikach z dodatkiem glicerolu (*Bielanski* — 1959 (2)).

Reasumując wyniki pierwszego doświadczenia można zaryzykować twierdzenie, że bez względu na rodzaj techniki dodawania glicerolu, nasienie glicerolizowane posiada lepszą zdolność przeżywania, aniżeli nasienie kontrolne (nasienie bez dodatku glicerolu). Ponadto wykazano, że z trzech kontrolowanych metod najbardziej skuteczną okazała się metoda III, tzn. dodatek glicerolu porcjami do nasienia ochłodzonego do temperatury +5°C.

Ocena laboratoryjna różnych rozrzedzalników nasienia zawierających glicerol oraz antybiotyki wykazała, że najlepsze wyniki otrzy-

mano przy stosowaniu rozrzedzalnika D (mleko + żółtko + glicerol + streptomycyna).

Stwierdzono to na podstawie przeżywalności nasienia zarówno w pierwszym jak i drugim okresie kontrolnym. W wynikach przeżywalności nasienia w rozrzedzalnikach B i C nie wykazano istotnych różnic. Podobnie statystycznie istotnych różnic nie stwierdzono w wynikach przeżywalności nasienia w rozrzedzalnikach A i B.

Na uwagę zasługuje fakt, że glicerolizację nasienia w tym doświadczeniu przeprowadzono techniką skróconą.

W podsumowaniu wyników drugiego doświadczenia należy podkreślić, że wykazano w nim przydatność zarówno glicerolu (wyrażna tendencja wzrostowa w wynikach przeżywalności po 10 dniach konserwacji) jak i antybiotyków, a szczególnie streptomycyny w konserwacji nasienia w temperaturze +5°C.

Otrzymane wyniki pokrywają się w zasadzie z wynikami badań między innymi *Sikesa* i *Merrilana* z 1958 r. (7), którzy stwierdzili również lepszą przeżywalność nasienia z dodatkiem glicerolu i streptomycyny. Przedłużoną żywotność plemników w nasieniu z dodatkiem glicerolu i antybiotyków wykazali również *Flipse* i *Almquist* w 1956 r. (3), *McLean* w 1956 r. (4) oraz *Willett* i *Ohms* w 1956 r. (9).

Uzyskane wyniki obserwacji laboratoryjnej dały podstawę do przeprowadzenia doświadczenia terenowego, które zostanie omówione w kolejnym doniesieniu.

#### Wnioski

1. Z trzech kontrolowanych metod glicerolizacji nasienia najlepsze wyniki otrzymano stosując dodatek glicerolu porcjami dopiero po ochłodzeniu nasienia rozcieńczonego do temperatury +5°C.

2. Porównując zachowanie się plemników w rozcieńczalniku mlekowo-żółtkowym zawierającym glicerol oraz antybiotyki stwierdzono najlepszą przeżywalność nasienia w rozrzedzalniku o następującym składzie: 10 ml żółtka, 10 ml glicerolu, 80 ml mleka oraz 0,1 g streptomycyny.

#### Piśmiennictwo

1. Almquist J. O.: Efficient, low cost results using milk-glycerol diluent. A. I. Dig. 7 (8), 11-14, 27, 1959.
2. Bielański Wł.: Informacje ustne, 1959.
3. Flipse R. J., Almquist J. O.: Diluters for Bovine Semen. IX. Motility of Bovine Spermatozoa in Milk-Glycine and Yolk-Glycine Diluents with and Without Glycerol. J. D. Sci., 39, 1690, 1956.
4. McLean J. M.: Results on the Use Bovine Semen Stored 6-10 Days in Homogenized Whole Milk with the Addition of 10% Glycerin. N.A.A.B. News, 4 (2), 13, 1956.
5. Rosłanowski K.: Badania wstępne nad dodatkiem gliceryny jako zabezpieczenie nasienia buhajów przed uszkodzeniem na skutek zamrażania w transporcie zimowym. Postępy Nauk Rol. 11, 161-163, 1957.
6. Rosłanowski K.: Zachowanie się plemników buhaja w rozrzedzalnikach z dodatkiem glicerolu. Cz. I. Przegląd piśmiennictwa. Med. Wet. 17, 40, 1961.
7. Sikes J. D., Merrilan C. P.: Preliminary Results on the Preservation of Bovine Semen in a Milk-Egg Yolk-Glycerol Extender. J. D. Sci., 41, 205, 1958.
8. Snyder J. W., Farmer E. L.: Fertility of bovine semen extended at 28-30°C in egg yolk-citrate with or without glycerin. J. D. Sci., 41, 1291-1292, 1958.

9. Willett E. L., Ohms J. I.: Livability of Spermatozoa in Diluters Containing Yolk-Citrate or Nonfat Milk Solids with Glycerol. J. D. Sci., 39, 1759, 1956.

Adres autora: lek. wet. Kazimierz Rosłanowski, Poznań, ul. Naramowicka 144.

Рослановский К. СОСТОЯНИЕ СЕМЕННЫХ КЛЕТОК ПЛЕМЕННОГО БЫКА В РАЗРЕЖАЛЬНИКАХ С ПРИБАВКОЙ ГЛИЦЕРОЛА.

И часть Дальнейшие наблюдения над прибавкой глицерола к семенным клеткам племенного быка.

Автором велись экспериментальные лабораторные исследования над влиянием глицерола а также антибиотиков на семенные клетки в молочно-желточном разрезальнике. Семя сохранялось в температуре +5°C. После применения трех различных методов прибавки глицерола автор заключает, что наиболее пригодным лабораторным методом является порционная прибавка к семени охлажденному до температуры +5°C. Сверх того автор установил, что семенные клетки сохраняют живучесть больше всего в разрезальнике в следующем составе: 10 мл желтка, 80 мл молока, 10 мл глицерола и 0,1 г стрептомицина.

Rosłanowski K. — Bull spermatozoa in diluents containing glycerol. II part. Further observations on the addition of glycerol to the semen of bull.

The author conducted laboratory studies on the influence of glycerol and antibiotics on the semen in the milk-yolk diluent. The semen was preserved at the temperature plus 5°C.

Examining the three different methods of the addition of glycerol the author found out that the most effective method under laboratory conditions is the adding of glycerol in portions to the semen cooled to the temperature plus 5°C.

The author proved also that the semen survives for the longest period of time in a diluent composed of: 10 ml of yolk, 80 ml of milk, 10 ml of glycerol and 0,1 g of streptomycin.

Rosłanowski K. — Le comportement du sperme du taureau dans les diluteurs avec addition du glycerol. II. partie: Observations ultérieures sur l'addition du glycerol au sperme du taureau.

L'auteur a effectué des expériences de laboratoire sur l'influence du glycerol et des antibiotiques sur le sperme dans des diluteurs de lait — jaune d'oeuf. Le sperme était conservé dans une température de +5°C.

En investigeant trois méthodes différentes de l'addition de glycérol l'auteur constate que la méthode la plus efficace pour le laboratoire est celle dans laquelle le glycérol est additionné par portions au sperme refroidi jusqu'à la température de +5°C.

De plus l'auteur a constaté que le sperme conserve sa vitalité le plus longtemps dans le diluteur composé de: 10 ml de jaune d'oeuf, 80 ml de lait, 10 ml de glycérol, 0,1 g de streptomycine.

Rosłanowski K. — Verhalten des Bullenspermas in der Verdünnungsflüssigkeit mit Zusatz von Glycerol. II. Teil. Weitere Beobachtungen über Zusatz von Glycerol zum Bullensperme.

Vom Verfasser wurden Laboratoriumsversuche über Einfluss vom Glycerol und Antibiotika auf Bullensperme in der Verdünnungsflüssigkeit von Milch und Eidotter durchgeführt. Das Sperma war in der Temperatur von +5°C aufbewahrt. Mit Anwendung von drei verschiedenen Methoden ist festgestellt worden, dass die wirksamste Laboratoriumsmethode die Methode vom partieweisen Zusatz vom Glycerol zum auf +5°C abgekühlten Sperma bildet.

Ausserdem bewies der Verfasser, dass die längste Vitalität des Sperma in folgend Zusammengesetzter Verdünnungsflüssigkeit: 10 ml Eidotter, 80 ml Milch, 10 ml Glycerol und 0,1 g Streptomycin erfolgt.