

Krzywda J., Króliński J., Hibner A. — **The influence of the localization of standings in litter tying stalls on the intensity of oestrus symptoms and some parameters of fertility in cows.**

The observations on the influence of standings localization in cowsheds on the intensity of oestrus symptoms, insemination index, longevity of service period, probability of abortions, sterility and frequen-

cy of stillborns were done in 7 herds of low-land black and white cows. There were observed 673 cows on 664 litter tying stalls (Grabner's tying). Statistically significant relationships pointing to an unprofitable influence of standings localized near boxes, windows and air holes on cows were found. The best appeared to be standings situated in the central part of a cowshed.

MARIAN TISCHNER, ANNA ALEKSANDER-BENDA

Próba przedłużenia czasu przeżywania rozmrożonego nasienia buhajów

Instytut Stosowanej Fizjologii Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

O ile w ostatnich latach osiągnięto znaczny postęp w poznaniu biochemicznych właściwości nasienia, to nadal jednak mało wiadomo na temat czynników wywierających wpływ na przeżywanie nasienia *in vitro*. Ten brak wiadomości hamuje racjonalne dobieranie składników do przygotowania odpowiednich rozrzedzalników dla nasienia (1).

W Polsce obecnie unasienia się około 4 mln krów nasieniem przechowywanym w ciekłym azocie w formie kulek. W początkowym okresie stosowania tej metody konserwacji nasienie rozmrażano w 2,9% roztworze cytrynianu sodu. Następnie Wierzbowski i Pilch (6) zaproponowali do rozmrażania nasienia buhajów roztwór fizjologiczny, który obecnie pod postacią izotonicznego roztworu soli kuchennej (0,9% NaCl) jest rutynowo stosowany w całej Polsce. Roztwór ten daje zadowalającą ruchliwość plemników zaraz po ich rozmrożeniu, jednak czas przeżywania nasienia w tym środowisku jest ograniczony. Dlatego też rozmrożone nasienie winno być użyte do inseminacji natychmiast. Niemniej większość techników inseminatorów rozmraża nasienie w punkcie lub u siebie w domu, przewożąc je następnie do odległych miejsc unasieniania krów. Powoduje to, że czas od rozmrożenia nasienia do jego użycia znacznie się wydłuża, a tym samym maleje wartość biologiczna takiego nasienia. Większe zaopatrzenie inseminatorów w samochody, sprzęt kriogeniczny, zmiana formy opakowania nasienia (słomki), oraz zalecenia, by dowozić nasienie do miejsc unasieniania krów w stanie zamrożonym, nie rozwiąże tego problemu całkowicie, a jeszcze bardziej podniesie koszt unasieniania i utrudni prace inseminatora w terenie. Dlatego też dla potrzeb inseminacji była nasieniem mrożonym w Polsce należy szukać takich rozwiązań, które gwarantowałyby uzyskanie normalnej płodności i nie utrudniały pracy techników inseminatorów. Jednym z tych rozwiązań mogłoby być użycie takiego rozrzedzalnika, który przy pełnym zachowaniu wartości biologicznej nasienia

przedłuża czas przeżywania *in vitro* rozmrożonych plemników.

W Nowej Zelandii (4) do konserwacji nasienia buhajów w stanie płynnym używany jest rozrzedzalnik kaprogenowy z dodatkiem katalazy. Dzięki niemu przedłużono znacznie czas konserwacji nasienia w temperaturze pokojowej, a także ograniczono liczbę plemników w dawce do $2,5 \times 10^6$. Wydawało się zatem celowym zastosowanie tego rozrzedzalnika po jego odpowiednim zmodyfikowaniu dla rozmrażania nasienia buhajów, a następnie porównanie jakości nasienia rozmrażanego w 2,9% roztworze cytrynianu sodu, w izotonicznym roztworze soli kuchennej oraz zmodyfikowanym rozrzedzalniku nowozelandzkim.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na nasieniu 6 buhajów, rasy neb, w wieku 4–8 lat, używanych do rozrodu w zakładach unasieniania przez okres od 14 do 54 miesięcy, które pod względem płodności nie wykazywały żadnych odchyśleń od normy. Od każdego buhaja pobrano po jednym ejakulacie i zamrożono wg ogólnie stosowanej metodyki.

Nasienie mrożono na suchym lodzie w formie kulek, używając rozrzedzalnika o składzie: 0,72 ml 2,9% roztworu dwuwodnego cytrynianu sodu, 1,25 g fruktozy, 20,0 ml żółtka jaja kurzego, 8,0 ml glicerolu, 0,1 g streptomycyny i 100 000 j. m. penicyliny.

Z każdego ejakulatu sporządzano po około 50 porcji nasienia zawierających 15–20 mln plemników żywych.

W pierwszym etapie badano czas przeżywania nasienia po jego rozmrożeniu w następujących 3 rozrzedzalnikach:

a) izotoniczny roztwór soli kuchennej (0,9% NaCl), przygotowany przez przemysł farmaceutyczny dla potrzeb inseminacji fabrycznie w szklanych ampulkach, zawierających po 1 ml płynu,

b) roztwór cytrynianu sodu z dodatkiem fruktozy o składzie: 100 ml wody destylowanej, 2,9 g dwuwodnego cytrynianu sodu, który po rozpuszczeniu gotowano przez 15 minut, a następnie po schłodzeniu odmierzano 72 ml płynu i dodawano do tej ilości 1,25 g fruktozy, całość dokładnie mieszano,

c) zmodyfikowany rozrzedzalnik nowozelandzki (3, 4), przygotowywany następująco: roztwór I o składzie — 100 ml wody destylowanej, 0,3 g glukozy, 1,0 g kwasu aminooctowego, 2,0 g dwuwodnego cytrynianu sodu; całość dokładnie mieszano aż do zupełnego roz-

puszczenia wszystkich składników, a następnie w oparciu o roztwór I sporządzano roztwór II — 2,5% kwas kapronowy oraz roztwór III — 2,5% katalazę wątrobową. Ostateczny roztwór IV przygotowywano dodając do 78 ml roztworu I po 1 ml 2,5% roztworu kwasu kapronowego (II) oraz 1 ml 2,5% roztworu katalazy wątrobowej (III) i uzyskując w ten sposób 80 ml roztworu ostatecznego (IV), w którym rozmrażano nasienie.

Proces rozmrażania nasienia we wszystkich badanych roztworach przeprowadzano w sposób jednaki. Do plastikowych podłużnych ampulek o pojemności 4 ml wlewano po 1 ml odpowiednio świeżo przygotowanych roztworów i umieszczano je w łaźni wodnej o temp. $+38^{\circ}\text{C}$. Rozmrażania kulek dokonywano równocześnie w ciągu 3 minut, a następnie pod mikroskopem przeprowadzano ocenę szacunkową ruchliwości plemników. Po rozmrożeniu nasienie przechowywano w lodówce o temp. około $+1^{\circ}\text{C}$ kontrolując żywotność plemników co 24 godziny aż do całkowitego zaniku ruchliwości plemników. Z każdego ejakulatu wykonano po 7-8 powtórzeń rozmrażania i prób przeżywania plemników.

Drugą część nasienia, stanowiącą po około 20 kulek (dawek) z każdego ejakulatu, przeznaczano do inseminacji krów w 3 punktach unasienniania. Inseminatorom zalecono, aby po 10 dawek każdego ejakulatu rozmrażali w izotonicznym roztworze soli kuchennej (0,9% NaCl) — kontrola, a drugie 10 dawek tego samego ejakulatu rozmrażali w rozrzedzalniku nowozelandzkim, który dostarczono im w odpowiednich ampulkach. Zalecono również, aby do inseminacji dobiegło inseminacji po raz pierwszy, a wszystkie czynności techniczne związane z zabiegiem unasienniania wykonywali wg własnej praktyki rutynowej. Wyniki unasienniania oceniono na podstawie „niepowtarzalności do 60–90 dni” oraz dat urodzonych cieląt. Zabiegi unasienniania krów wykonywano w okresie jesiennym.

Wyniki i omówienie

Nasienie 6 badanych buhajów, zarówno świeże jak i po rozmrożeniu charakteryzowało się dobrą ruchliwością, od 60–80% plemników o ruchu postępowym.

Po rozmrożeniu nasienia wykonano ogółem 140 prób kontroli czasu przeżywania plemników w temp. $+1^{\circ}\text{C}$. Wyniki tych badań wykazały, że najdłużej przeżywa nasienie w rozrzedzalniku nowozelandzkim (średnio 213 godzin), krócej w izotonicznym roztworze soli kuchennej używanym powszechnie w Polsce (średnio 130 godzin) i najkrócej w roztworze cytrynianu sodu (średnio 97 godzin). Dla nasienia wszystkich badanych buhajów różnice w czasie przeżywania po rozmrożeniu w 3 badanych płynach okazały się statystycznie istotne (tab. 1), co świadczy o dużym znaczeniu środowiska rozrzedzalnika dla przeżywania nasienia po jego rozmrożeniu. U 3 spośród 6 badanych buhajów nasienie przeżywało w rozrzedzalniku nowozelandzkim o 4–6 dni dłużej niż w izotonicznym roztworze soli kuchennej. Badanym nasieniem unasienniono ogółem 113 krów, w tym 56 nasieniem rozmrożonym w izotonicznym roztworze soli kuchennej i 57 nasieniem rozmrożonym w rozrzedzalniku nowozelandzkim. Zarówno po nasieniu rozmrożonym w płynie izotonicznym, jak i w rozrzedzalniku nowozelandzkim uzyskano bardzo wysoki

wskaźnik płodności, który przekraczał 60% wycieleń.

Zbyt mała liczba unasiennionych krów nie pozwala na wyciągnięcie ostatecznych wniosków co do praktycznej przydatności i przewagi rozrzedzalnika nowozelandzkiego nad innymi rozrzedzalnikami używanymi do rozmrażania nasienia. Uzyskane wyniki wskazują jednak, że nie wywarł on ujemnego wpływu na wskaźnik wycieleń, a wyraźnie poprawił przeżywanie nasienia w warunkach *in vitro*. Jego przydatność w warunkach terenowych może być szczególnie wysoka w przypadkach potrzeby dłuższego czasu przechowywania nasienia po rozmrożeniu.

Tab. 1. Przeżywanie nasienia buhajów (w godzinach) po rozmrożeniu w temp. $+1^{\circ}\text{C}$ w 3 różnych rozrzedzalnikach

Nr buhaja	Izotoniczny roztwór soli kuchennej (0,9% NaCl)	Cytrynian sodu z dodatkiem fruktozy	Zmodyfikowany rozrzedzalnik nowozelandzki
1	115 (60—132)	104 (60—156)	160 ** (132—204)
2	139 (132—156)	118 (84—204)	228 * (156—372)
3	118 (84—156)	77 (36—136)	211 ** (132—372)
4	153 (108—204)	115 (84—204)	343 ** (228—468)
5	177 (90—204)	105 (60—180)	190 * (60—324)
6	80 (60—108)	62 (60—84)	149 ** (108—204)
Razem (wahania)	130 (60—204)	97 (36—204)	213 (60—468)

Objaśnienia: ** różnica statystycznie istotna przy $p \leq 0,01$, * przy $p \leq 0,05$.

Istnieje szereg czynników, które mogą mieć bezpośredni wpływ na płodność nasienia buhajów. Parež (cyt. 4) podaje, że użycie do unasienniania nasienia przetrzymywanego po rozmrożeniu do jednej godziny daje normalną płodność. Natomiast przechowywanie takiego nasienia przez 6–18 godzin powoduje, niezależnie od użytego buhaja, gwałtowne obniżenie zapłodnień o 12 do 45%. Jak podaje Shannon (4) zastosowana w rozrzedzalniku katalaza wątrobową ma za zadanie chronić plemniki przed ujemnym wpływem H_2O_2 , która powstaje pod wpływem działania aminooksydazy na żółtko jaja kurzego, powszechnie używane w rozrzedzalnikach dla nasienia buhajów. Normalnie w plemnikach żywych aminooksydaza jest enzymem nieaktywnym, uaktywnia się w nasieniu dopiero w przypadku obecności w nim martwych plemników.

Istotny wpływ na czas przeżywania nasienia i jego płodność posiada kwas kapronowy. W próbach z nasieniem wykonanych na liczbę

nym materiale (4) nie wywierał on istotnego wpływu na płodność nasienia użytego do inseminacji w dniu pobrania, lecz istotnie podniósł płodność nasienia płynnego w następnych dniach po pobraniu. Nie stwierdzono jednak dodatniego wpływu na płodność w przypadku dodania go do rozrzedzalnika dla zamrażania nasienia.

Kontrola czasu przeżywania nasienia została w przeprowadzonych badaniach oparta na teście opracowanym dla nasienia ogierów (2, 5). Test kontroli przeżywania nasienia w temp. $+1^{\circ}\text{C}$ pozwala na lepsze różnicowanie jakościowe nasienia w porównaniu do kontroli przeżywania w temp. $+38^{\circ}\text{C}$ i $+46,5^{\circ}\text{C}$. Wstępne obserwacje własne nad liczbą zmian morfologicznych plemników nasienia buhaja w stosunku do czasu przeżywania tego nasienia w temp. $+1^{\circ}\text{C}$ wykazywały dodatnią korelację między obu cechami.

Wnioski

1. Zmodyfikowany rozrzedzalnik nowozelandzki w porównaniu z izotonicznym roztworem soli kuchennej i 2,9% roztworem cytrynianu sodu z dodatkiem fruktozy w sposób istotny przedłuża *in vitro* czas przeżywania nasienia buhaja po rozmrożeniu.

2. Istnieje dalsza potrzeba doskonalenia rozrzedzalników używanych dla rozmrażania nasienia buhajów używanych do inseminacji w Polsce.

Piśmiennictwo

1. De Kruif A.: J. Reprod. Fert. 54, 507, 1978.

2. Parszutin G. W., Skatkin P. N.: Vstn. sel'skolw. Nauki Ziwotn. 2, 154, 1940.
 3. Pilch J., Szczęśniak B., Wierzbowski S.: Medycyna Wet. (w druku).
 4. Shannon P.: J. Reprod. Fert. 54, 519, 1978.
 5. Tischner M.: J. Reprod. Fert., Suppl. 27, 53, 1979.
 6. Wierzbowski S., Pilch J.: Nasienie mrożone w inseminacji bydła, PWRiL, 1970, s. 39.
- Adres autora: doc. dr hab. Marian Tischner, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków.

Тишнер М., Александер-Бенда А. — Попытка выживаемости размороженного семени быков.

Исследовали влияние 3 разбавителей на период выживаемости живчиков и плодовитость курпного рогатого скота. Самой продолжительной выживаемостью отличалось семя, размороженное в модифицированном новозеландском разбавителе (в среднем 213 часов), более краткой — в изотоническом растворе столовой соли (в среднем 130 часов) и самой краткой — в растворе цитрата натрия с прибавкой фруктозы (в среднем 97 часов). Среди 113 коров, осемененных семенем, размороженным в изотоническом растворе столовой соли как и в модифицированном новозеландском разбавителе, получили высокий показатель отелов.

Tischner M., Aleksander-Benda A. — A trial of prolongation of survival time of defrosted semen of bulls.

The influence of three diluents on the survival time of spermatozoons and cow's fertility was examined. The longest survival time revealed defrosted semen in a modified New Zealand diluent (mean time — 213 hr), shorter survived defrosted semen in an isotonic solution of sodium chloride (mean time — 130 hr), and the shortest survival time revealed defrosted semen a solution of sodium citrate with fructose (mean time — 97 hr). In 113 cows inseminated with defrosted semen in an isotonic solution of sodium chloride or in a modified New Zealand diluent a high index of calvings was obtained.

SISAK M., RYBNIKAR A.: Określanie efektywności trichofitycydnej niektórych roztworów środków odkażających w oparciu o prostą metodę orientacyjną. (Determination of trichophycidal efficiency of some disinfection solutions using a simple orientation method). Acta vet. Brno 29, 245—250, 1980 (3—4).

Badania miały na celu określenie działania fungicydowego w stosunku do 14 i 22 dniowej hodowli zarodnikującego szczepu *Trichophyton verrucosum* (Bodin 1902) wodnych roztworów orthosanu BF, ajatinu, jodonalu B, formaldehydu, wodorotlenku sodu i persterilu. Najlepsze wyniki uzyskano w przypadku persterilu, który w stężeniach 1,2 i 4% po 5 minutowej ekspozycji działał fungicydnie. Formaldehyd w 45% stężeniu wywierał działanie fungicydne również po 5 minutach ekspozycji. Pozostałe badane preparaty działały fungistatycznie. W przypadku Mycolastanox F efekt fungicydny uzyskiwano po 5 minutowej ekspozycji grzyba na stężenie 0,3% i po 1 minutowej ekspozycji na stężenie 0,5%.

G.

HEJDUK J., SVOBODOVA Z.: Ostra toksyczność dla ryb pestycydów karbaminianowych. (Acute toxicity of carbamate-based pesticides for fish. Acta vet. Brno 49, 251—257, 1980 (3—4).

W oparciu o testy ostrego zatrucia ryb przebadano toksyczność następujących pestycydów karbaminianowych: Nowoziar MN 80, Elocron WP 50, Furadan 5-G,

Fundazol. W badaniach stosowano karpie (*Cyprinus carpio*), pstragi tęczowe (*Salmo gairdneri*) i *Poecilia reticulata*. Najwyższą toksyczność ostrą posiadał Furadan G-5, najniższą fundazol. LC_{50} Furadanu wynosiła dla karpia $11,0 \mu\text{g l}^{-1}$, pstrągów $3,4 \mu\text{g l}^{-1}$, *P. reticulata* $3,4 \mu\text{g l}^{-1}$ w okresie 48 godzin. Najbardziej wrażliwe na działanie pestycydów karbaminianowych były karpie. Jednakże zmiany anatomopatologiczne wywołane przez pestycydy karbaminianowe nie były swoiste.

G.

HIFIFREK B., DRABEK J.: Działanie cytostatyczne cyklofosfamidu na szpik kostny owiec. (Cytostatic effect of cyclophosphamide on bone marrow in sheep). Acta vet. Brno 49, 217—222, 1980 (3—4).

Cyklofosfamid (2% roztwór) w dawce $25 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ masy ciała stosowany dożylnie u owiec rasy merynos wywierał krótkotrwałe silne działanie cytostatyczne na hemopojęz w szpiku kostnym. Największe zmiany dotyczyły układu czerwokrwinkowego. W układzie białokrwinkowym obniżała się wyłącznie liczba komórek dojrzałych (neutrofile, metamyelocyty i granulocyty). Po depresji trwającej 2—4 dni wzrastała erytropoeza i myelopoeza, zaś po 22 dniach po podaniu preparatu liczba badanych komórek powracała do stanu wyjściowego.

G.