

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

KRYSTYNA SAWICKA-WRZOSEK, ANNA GOSIEWSKA

Zanieczyszczenia bakteryjne nasienia buhajów w stacjach unasienniania

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Lechicka 21, 02-156 Warszawa

Wartość biologiczna nasienia buhajów uwarunkowana jest czynnikami genetycznymi, stanem odżywienia, pielęgnacji, a także w pewnym stopniu obecnością drobnoustrojów zanieczyszczających ejakulaty. Za zanieczyszczenie nasienia drobnoustrojami uważa się występowanie w nasieniu drobnoustrojów niechorobotwórczych lub warunkowo chorobotwórczych, które mogą pochodzić z dróg moczowopłciowych buhaja, z jamy napletkowej lub dostawać się do nasienia w czasie jego pobierania, obróbki i przechowywania.

Do najczęściej spotykanych w nasieniu drobnoustrojów należą: *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *Corynebacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptococcus sp.* Przy kryciu naturalnym drobnoustroje te nie wpływają ujemnie na wartość zapładniającą nasienia. Inaczej natomiast jest przy sztucznym unasiennianiu, ponieważ przechowywanie nasienia sprzyja oddziaływaniu tych mikroorganizmów na plemniki, a unasiennianie do kanału szyjkowego lub do macicy eliminuje oddziaływanie na nasienie śluzu szyjkowego stanowiącego pewną barierę ochronną. Dlatego też liczne są badania nad wpływem niektórych grup drobnoustrojów, a także ich ilości na wartość zapładniającą nasienia. Większość autorów zgodnie uważa, że zanieczyszczenia bakteryjne znajdujące w nasieniu buhajów inseminacyjnych mogą oddziaływać ujemnie na jego wartość zapładniającą (1, 5, 8, 10, 14). Jest to związane z oddziaływaniem na plemniki toksyn, produktów przemiany materii, a także produktów powstałych w wyniku rozpadu bakterii. Można ogólnie przyjąć, że istnieje korelacja między zawartością drobnoustrojów w nasieniu a zdolnością zapładniającą poszczególnych ejakulatów. Rozbieżności są natomiast co do ustalenia krytycznej liczby drobnoustrojów w 1 ml (5, 10, 13, 14).

Ważne miejsce wśród mikroorganizmów zanieczyszczających nasienie zajmuje pałeczka ropy błękitnej. Występuje ona często u buhajów stacjonujących w zakładach unasienniania, znana jest także oporność tego drobnoustroju na antybiotyki i wiele chemioterapeutyków. Notowano także niekorzystny wpływ *Pseudomonas aeruginosa* na przeżywalność plemników w

nasieniu i skuteczność zabiegów inseminacyjnych (8, 9). Głównym czynnikiem wpływającym na stopień zanieczyszczeń bakteryjnych nasienia jest ogólny stan higieniczny w zakładach unasienniania, a więc: higiena pomieszczeń dla zwierząt, higiena stanowisk, okólników, higiena sprzętu do pielęgnacji buhajów, sprzętu do pobierania nasienia i higiena pomieszczeń laboratoryjnych. Roslanowski i wsp. (15) na podstawie przeprowadzonych badań dowodzą, że średnią liczbę drobnoustrojów w 1 ml nasienia można uważać za jeden z wykładników stanu higienicznego zakładu. Zdaniem autorów wyniki ilościowych badań bakteriologicznych nasienia buhajów mogą stanowić cenną wskazówkę dla służby weterynaryjnej pełniącej nadzór nad zakładami unasienniania.

Celem pracy było określenie ilościowego i jakościowego stopnia zanieczyszczenia bakteryjnego nasienia buhajów znajdujących się w stacjach hodowli i unasienniania zwierząt.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło nasienie buhajów świeże, mrożone i przechowywane w stanie płynnym, pochodzące z zakładów inseminacyjnych z rejonu warszawskiego. Ogółem zbadano 439 ejakulatów, w tym 362 próbki nasienia mrożonego, 17 — nasienia przechowywanego w stanie płynnym i 60 próbek nasienia świeżego. Badania przeprowadzono zgodnie z obowiązującą Instrukcją nr 49 Min. Rolnictwa — Dep. Wet. (4) dotyczącą mikrobiologicznego badania nasienia buhajów. Badanie bakteriologiczne nasienia buhajów obejmowało:

a) określenie liczby drobnoustrojów metodą posiewu powierzchniowego: 0,1 ml nasienia rozcieńczonego roztworem fizjologicznym soli w stosunku 1:10, 1:100, 1:1000 posiewano na płytki agarowe z dodatkiem krwi, następnie inkubowano w temp. 37°C przez 48 godz., po czym liczono wyrosłe kolonie,

b) określenie rodzaju drobnoustrojów — nierozcieńczone nasienie posiewano na płytki agaru z krwią, na podłoże Mc Conkeya i na podłoże Edwardsa. Po 24—48 godz. inkubacji w temp. 37°C wyrosłe kolonie identyfikowano zgodnie z ogólnie przyjętą metodyką bakteriologiczną (2, 4, 12). Podstawę do oceny badanego nasienia stanowiły Tymczasowe wytyczne Min. Rolnictwa — Dep. Wet. w sprawie oceny warunków sanitarno-higienicznych w stacjach hodowli i unasienniania zwierząt (17). Za górną dopuszczalną granicę zanieczyszczenia nasienia zgodnie z obowiązującymi wytycznymi uważa się 150×10^3 drobnoustrojów w 1 ml nasienia mrożonego, 50×10^3 drobnoustrojów w 1 ml nasienia przechowywanego w stanie płynnym i 500×10^3 drobnoustrojów w 1 ml nasienia świeżego.

Jeżeli 80% ilości badanych zwierząt spełnia te warunki — stan higieniczny badanego zakładu uważa się za prawidłowy.

Wyniki i omówienie

Różnice w ogólnej liczbie drobnoustrojów w 1 ml nasienia buhajów w badanych zakładach unasienniania były znaczne (tab. 1). Podczas gdy w zakładzie A w 1980 r. ogólna liczba drobnoustrojów w 1 ml nasienia wynosiła 22×10^3 , to w analogicznym okresie w zakładzie C osiągnęła ona wartość 129×10^3 . W 1981 r. najwyższą liczbę drobnoustrojów (38×10^3) stwierdzono w zakładzie D, najniższą (3×10^3) natomiast w zakładzie C. Badania prowadzono przez okres dwóch lat. W 1981 r. nastąpiło pewne obniżenie liczby drobnoustrojów w nasieniu w stosunku do 1980 r. (tab. 1). Jest to szczególnie widoczne na przykładzie zakładu C, w którym w 1980 r. w 1 ml nasienia stwierdzono 129×10^3 , a w 1981 r. 3×10^3 drobnoustrojów. W innych zakładach, które w 1980 r. osiągnęły lepsze wyniki badań różnice te nie są aż tak duże. W zakładzie A średnia liczba drobnoustrojów z 22×10^3 w 1980 r. zmniejszyła się do 5×10^3 w 1981 r.; w zakładzie D — z 97×10^3 w 1980 r. do 38×10^3 w 1981 r. i w zakładzie E z 97×10^3 w 1980 r. do 10×10^3 w 1981 r. W pracy nie porównywano wyników uzyskanych przez zakład B, gdyż w 1980 r. przysłał on do badania nasienie świeże, natomiast w 1981 r. nasienie mrożone i konserwowane w stanie płynnym. W świetle obowiązujących wytycznych w 1980 r. stan sanitarno-higieniczny 3 spośród badanych zakładów można uznać za prawidłowy, w dwóch zakładach natomiast budził zastrzeżenia (tab. 2). W zakładzie C w 1980 r. odsetek próbek nasienia mrożonego odpowiadających wymogom wynosił 78,4%, podczas gdy w nasieniu świeżym był wyższy — 90,5%. Świadczy to o niskiej higienie obróbki nasienia (niewłaściwa sterylizacja sprzętu, rozcieńczalników, a także niewłaściwa higiena pomieszczeń laboratoryjnych), w czasie której następuje dodatkowe zanieczyszczenie. W stacji B wyniki badań nasienia świeżego w 1980 r. wskazywały na zły stan higieniczny zakładu, gdyż tylko 71,7% badanych próbek odpowiadało wymogom normy. Odsetek próbek w nasieniu mrożonym spełniających wymogi normy we wszystkich zakładach był zadowalający. Jedynie w zakładzie B obok dobrego stanu higienicznego nasienia mrożonego stwierdzono zbyt niski odsetek ejakulatów zawierających mniej niż 50×10^3 drobnoustrojów/1 mln nasienia konserwowanego w stanie płynnym (70,5%). Świadczy to o niewłaściwych warunkach sanitarno-higienicznych procesu konserwacji. Także odsetek próbek, w których notowano całkowity brak wzrostu flory bakteryjnej był różny w poszczególnych zakładach (tab. 3). W 1980 r. w zakładzie A i B wynosił on 0, podczas gdy w pozostałych zakładach wahał się od 12,8%—

Tab. 1. Średnia ilość drobnoustrojów w 1 ml nasienia w poszczególnych zakładach unasienniania

Rok	Zakład unasienniania	Średnia ilość drobnoustrojów w 1 ml nasienia (w tysiącach)		
		świeżego	mrożonego	przechowywanym w stanie płynnym
1980	A	—	22,1	—
	B	318,4	—	—
	C	159,1	129,7	—
	D	—	97,2	—
	E	—	97,2	—
1981	A	—	5,8	—
	B	—	13,1	97,1
	C	—	3,0	—
	D	—	38,3	—
	E	—	10,9	—

Tab. 2. Odsetek próbek nasienia zgodnych z obowiązującymi wytycznymi

Rok	Zakład unasienniania	Odsetek próbek w nasieniu (%)		
		świeżym	mrożonym	przechowywanym w stanie płynnym
1980	A	—	97,3	—
	B	71,9	—	—
	C	90,4	78,4	—
	D	—	82,9	—
	E	—	83,3	—
1981	A	—	100,0	—
	B	—	100,0	70,5
	C	—	100,0	—
	D	—	94,1	—
	E	—	98,1	—

Tab. 3. Odsetek próbek, w których stwierdzono brak wzrostu

Rok	Zakład unasienniania	Odsetek próbek w nasieniu (%)		
		świeżym	mrożonym	przechowywanym w stanie płynnym
1980	A	—	0	—
	B	0	—	—
	C	19,0	13,7	—
	D	—	12,7	—
	E	—	20,8	—
1981	A	—	17,4	0
	B	—	0	—
	C	—	69,5	—
	D	—	5,8	—
	E	—	16,9	—

20,8%. W 1981 r. nastąpiła poprawa w zakładzie A, gdzie odsetek ten od 0 zwiększył się do 17,1%, a także w zakładzie C, gdzie z 13,7% w 1980 r. wzrósł do 69,6% w 1981 r.

Piśmiennictwo

Z drobnoustrojów fakultatywnie patogennych najczęściej stwierdzano obecność *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus beta-haemolyticus* i *Corynebacterium pyogenes* występujący tylko sporadycznie. *Streptococcus beta-haemolyticus* wyizolowano w 1980 i 1981 r. w zakładzie C w 3 próbkach, w zakładzie E w 7, *Corynebacterium pyogenes* natomiast w zakładzie A w 1 próbce, w zakładzie C również w 1 próbce i w zakładzie D w 2 próbkach. Znacznie poważniejszy problem stanowiła pałeczka ropy błękitnej. Na 5 badanych tylko jeden zakład D był od niej całkowicie wolny zarówno w 1980 r. jak i w 1981 r. (tab. 4). W pozostałych zakładach odsetek ejakulatów zanieczyszczonych *Pseudomonas aeruginosa* wynosił od 5,4%—52,4% w 1980 r. i od 4,3—58,8% w 1981 r. W 1981 r. w stosunku do 1980 r. nastąpiła poprawa. W zakładzie A odsetek próbek zanieczyszczonych pałeczką ropy błękitnej spadł z 5,4% do 0, w zakładzie C z 35,3% w nasieniu mrożonym do 4,3%. Jedynie w zakładzie B utrzymywał się stale na wysokim poziomie.

Tab. 4. Odsetek prób zanieczyszczonych *Pseudomonas aeruginosa*

Rok	Zakład unasienniania	Odsetek próbek w nasieniu (%)		
		świeżym	mrożonym	przechowywanym w stanie płynnym
1980	A	—	5,4	—
	B	41,0	—	—
	C	52,3	35,3	—
	D	—	0	—
	E	—	14,5	—
1981	A	—	0	—
	B	—	5,5	58,8
	C	—	4,3	—
	D	—	0	—
	E	—	13,2	—

Z analizy wyników badań można wyciągnąć wniosek, że pewna poprawa warunków sanitarno-higienicznych w badanych zakładach unasienniania wiąże się z wprowadzeniem Instrukcji nr 49 dotyczącej mikrobiologicznego badania nasienia buhajów, a także Tymczasowych wytycznych w sprawie oceny warunków sanitarno-higienicznych w stacjach hodowli i unasienniania zwierząt. Ujednoliciło to metody badań, a także kryteria oceny, dając równocześnie podstawy do działań weterynaryjnych w ramach nadzoru nad zakładami unasienniania. Działania te muszą prowadzić do polepszenia warunków sanitarno-higienicznych, gdyż zdaniem niektórych autorów (3, 7, 11, 16) nie zabiegi doraźne jak odkażanie jamy napletkowej, czy też toaleta podbrzusza przed pobraniem nasienia, a trwała poprawa warunków higienicznych stanowisk oraz całego procesu obróbki nasienia może spowodować zmniejszenie zanieczyszczeń bakteryjnych ejakulatów.

1. Boryczko Z.: *Medycyna Wet.* 34, 331, 1978.
2. Buttiaux R.: *Manuel de techniques bacteriologiques*, E. M. F., Paris, 1969.
3. Hoffman-Woźniak K., Rogoźiewicz H., Jaśkowski L.: *Medycyna Wet.* 32, 583, 1976.
4. Instrukcja nr 49 Min. Rolnictwa — Dep. Wet. z dnia 9 grudnia 1978 r. *Wet. SpIII-640/11/78* dot. mikrobiologicznego badania nasienia buhajów.
5. Jaśkowski L.: *Medycyna Wet.* 21, 552, 1965.
6. Kozłowska L., Hoffman-Woźniak K., Jaśkowski L.: *Medycyna Wet.* 32, 546, 1976.
7. Króliński J.: *Medycyna Wet.* 33, 164, 1977.
8. Króliński J.: *Medycyna Wet.* 33, 298, 1977.
9. Króliński J.: *Medycyna Wet.* 33, 603, 1977.
10. Króliński J.: *Medycyna Wet.* 34, 47, 1978.
11. Nowakowski K., Wierzbowski S.: *Medycyna Wet.* 34, 488, 1978.
12. Oliver H. R.: *Traite de biologie applique*, t. II, L. M., Paris, 1963.
13. Pilch J., Rostanowski K.: *Medycyna wet.* 33, 662, 1977.
14. Romaniuk J.: *Medycyna Wet.* 21, 424, 1965.
15. Rostanowski K., Losiński T., Michalkiewicz M.: *Medycyna Wet.* 33, 33, 1977.
16. Wierzbowski S., Szmyd D.: *Medycyna Wet.* 32, 339, 1976.
17. Tymczasowe wytyczne Min. Rolnictwa Dep. Wet. w sprawie oceny warunków sanitarno-higienicznych w stacjach hodowli i unasienniania zwierząt *Wet. SpIII/640/1/79* z dnia 1.02.1978.

Adres autora: dr Krystyna Sawicka-Wrzosek, ul. Filtrowa 62 m. 17, 02-057 Warszawa.

Савицкая-Бжосек К., Госевская А. — Бактериальные загрязнения бычьего семени на осеменительных станциях

Celю исследований состояла в определении степени количественного и качественного загрязнения семени быков, находящихся на станциях разведения и осеменения животных. Материал для исследований составляло свежее, замороженное и консервированное в жидком состоянии семя быков, происходящее из осеменительных пунктов. В общем исследовали 439 эякулятов, в том 362 пробы замороженного семени, 17 проб семени, консервированного в жидком состоянии, и 60 проб свежего семени. Определяли общее число микроорганизмов методом поверхностного посева, а также род микроорганизмов. Разности в общем числе микроорганизмов в 1 мл бычьего семени в исследуемых осеменительных пунктах были значительны. Общее число микроорганизмов для замороженного семени составляло в 1980 г. 22×10^3 — 129×10^3 , а в 1981 г. 3×10^3 — 38×10^3 . В 1981 г. последовало некоторое улучшение по сравнению с 1980 г. Из факультативно патогенных микроорганизмов чаще всего отмечали *Pseudomonas aeruginosa*. Процент эякулятов, загрязненных этим микроорганизмом, составлял 5,4—52,4% в 1980 г. и 4,3—58,8% — в 1981 г.

Sawicka-Wrzosek K., Gosiewska A. — Bacterial contaminations of semen of bulls in insemination centres

The purpose of the examinations was to establish the level of quantitative and qualitative contamination of semen of bulls in breeding and insemination centres. The experiments were performed with fresh, frozen, and stored at a liquid state semen obtained from insemination centres. 439 ejaculates were examined, among them 362 samples of a frozen semen, 17 samples of semen stored at a liquid state and 60 samples of a fresh semen. A total number and a kind of bacteria contaminating of semen was determined. There were noted great differences in a total number of bacteria in 1 ml of semen obtained from the investigated insemination centres. A total number of bacteria in 1 ml of semen was in 1980 22×10^3 — 129×10^3 , in 1981 3×10^3 — 38×10^3 . Among facultative pathogens predominated *Pseudomonas aeruginosa*. Per cent of ejaculates contaminated with *P. aeruginosa* was 5.4—52.4 in 1980 and 4.3—58.8 in 1981.