

znaczny stopień zakażenia pał. *Salmonella* (11,8%).

2. Wśród wyizolowanych serotypów dominowały pał. *Salmonella* należące do grupy E.

3. Lepsze wyniki przy badaniu bakteriologicznym mięsa końskiego uzyskano w metodzie I, w której stosowano preinkubację w 43°C, oraz posiewano dziesięciokrotnie większe ilości materiału.

#### Piśmiennictwo

1. Buczowski S., Strzelecki E., Pietkiewicz K., Cader-Strzelecka B.: *Medycyna Wet.* 26, 449, 1970.

2. Dziadek A., Kempski W., Łosiński T., Wystouch W.: *Medycyna Wet.* 26, 149, 1970.
3. Furowicz A., Butrym-Malczyńska B., Wachowicz R.: *Medycyna Wet.* 25, 407, 1969.
4. Goliszewski K., Meuszyński S., Terech J.: *Medycyna Wet.* 27, 106, 1971.
5. Meuszyński S., Popielewicz K.: *Medycyna Wet.* 26, 155, 1970.
6. Meuszyński S.: *Medycyna Wet.* 26, 453, 1970.
7. Maciarewicz M., Brandes S.: Wykrywanie i różnicowanie drobnoustrojów z rodziny Enterobacteriaceae, cz. II, PZH 1964.
8. Pankiewicz Z.: *Medycyna Wet.* 23, 426, 1967.
9. Sylwester K., Adamczyk E.: *Medycyna Wet.* 27, 42, 1971.
10. Stuzewska M., Truszczyński M.: *Medycyna Wet.* 26, 455, 1970.
11. Ugorski L.: Biuletyn IV Zjazdu PTNW 1970.

Adres autora: lek. wet. Jerzy Molenda, Wrocław, ul. Rodakowskiego 6.

## FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

MONIKA PIASECKA-SERAFIN

### Wpływ osadu nagromadzonego w kontenerach na zakażenie nasienia zamrażanego w kulkach i przechowywanego w ciekłym azocie (−196° C)

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt  
Instytutu Zootechniki

Kierownik: prof. dr S. WIERZBOWSKI

Zastosowanie ciekłego azotu (−196°C) do przechowywania materiału biologicznego otwiera nowy zakres badań mikrobiologicznych. Wraz z materiałem biologicznym możemy bowiem w sposób niezamierzony przechowywać drobnoustroje, które mogą stanowić zagrożenie dla konserwowanego materiału oraz jego biorcy, możemy również stworzyć rezerwuuar drobnoustrojów na okres, kiedy ich obecne niektóre populacje zwalczane przez człowieka wyginą lub zmieniają swoje cechy biologiczne.

Wykazano, że w środowisku ciekłego azotu komórki bakteryjne pozbawione jakiegokolwiek osłony cząstek organicznych lub innych zachowują swoje właściwości enzymatyczne i zjadliwość (Piasecka 1970).

Wprowadzenie do praktyki inseminacyjnej nasienia konserwowanego w ciekłym azocie stworzyło równocześnie zagrożenie przechowywania wraz z nasieniem różnych drobnoustrojów. Metoda konserwowania nasienia w ciekłym azocie w postaci nieosłoniętych kulek, wniosła znaczne uproszczenie techniczne dając dobre wyniki inseminowania. Szereg autorów zwróciło uwagę na przenoszenie zarazków za pośrednictwem ciekłego azotu z kulek zakażonego nasienia na kulki nie zawierające drobnoustrojów (1, 2, 4, 8).

Wykazano jednak, że zakażenie jednych kulek nasienia od drugich za pośrednictwem ciek-

łego azotu wymaga bardzo dużej koncentracji zarazków w kulkach stanowiących źródło zakażenia (4, 5).

W pracy niniejszej pragnęliśmy prześledzić proces utworzenia się osadu w kontenerze w czasie przechowywania nasienia w kulkach oraz ustalić czy osad nagromadzony w czasie przechowywania kulek zawierających bakterie odgrywa rolę w zakażeniu nasienia wolnego od drobnoustrojów i w jakim czasie następuje jego ewentualna infekcja.

#### Materiał i metody

##### I. Nagromadzenie zakażonego osadu

1. Kontener typu LRN-25 produkcji Union Carbide został wyjałowiony po czym umieszczono w nim 5 pojemników, z których każdy zawierał po 12 plastikowych dziurkowanych pudełeczek, w których znajdowały się kulki zakażone lub jałowe. W celu zakażenia tworzącego się osadu włączone zostały do kontenera pudełeczka z kulkami zakażonymi, które stanowiły 1/3 część zawartości kontenera i zostały umieszczone na różnych wysokościach. Kulki jałowe umieszczone w oddzielnych pudełeczkach posłużyły do wypełnienia wnętrza i stworzenia warunków zbliżonych do naturalnych dla nagromadzenia osadu w czasie przechowywania nasienia w ciekłym azocie.

2. Jałowo przygotowany rozcieńczalnik cytrynianowo-glicerynowo-żółtkowy został użyty zamiast nasienia dla przygotowania kulek jałowych (4).

3. Szczepy bakteryjne o ustalonych właściwościach biochemicznych *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, pałeczka otoczkowa, zostały użyte do przygotowania kulek zakażonych w sposób opisany (4).

4. Podłoża bakteriologiczne: płytki agarowe z dodatkiem 5% odwióknionej krwi baraniej, Bacto Levine EMB Agar, *Staphylococcus medium* 110, bulion z glukozą, wszystko sporządzane z preparatów firmy Difco.

5. Kontener wypełniony jak w punkcie 1 pozostawiono z jego zawartością przez okres 3 lat wykonując okresowo kontrolne posiewy kulek i azotu. Po wymienionym okresie czasu z kontenera usunięto pudełeczka z kulkami oraz azot. Z oszronionych wewnętrznych ścian i dna kontenera zostały pobrane wymazy przy pomocy jałowych tamponów umieszczonych na długich prętach. Posiewy tych wymazów wykonano dla określenia stopnia zakażenia osadu.

II. Badanie możliwości zakażenia jałowych kulek przez osad.

Kontener zawierający zakażony osad napełniono świeżym azotem. W pojemnikach umieszczono jałowe pudełeczka jak w punkcie 4 wypełnione jałowymi kulkami wykonanymi z zamrożonego rozcieńczalnika. Pudełeczka w pojemnikach umieszczono tak, że 3 górne były oddzielone pustą przestrzenią od pozostałych i znajdowały się ponad powierzchnią azotu w jego parach.

Przygotowując kulki jałowe, tym razem rozcieńczalnik wkraplano miarowo wprost do azotu znajdującego się w jałowej wanience w której również napełniano pudełeczka, przy pomocy jałowej szpatułki. Ten sposób zapewniał szybkie i łatwe uzyskanie jałowych kulek.

Posiewy kontrolne rozcieńczalnika wykonano bezpośrednio po jego przygotowaniu z resztek, które pozostały po sporządzeniu kulek, oraz losowo z zamrożonych kulek w czasie wkładania ich do pudełeczek przed zanurzeniem w azocie w badanym kontenerze. Posiewy jałowo przygotowanych kulek wykonywano po 2, 4, 6 i 24 godzinach oraz 5 i 9 dniach od umieszczenia ich w kontenerze. Kulki znajdujące się w parach azotu wysiewano po 2, 4, 6 i 24 godzinach, później zostały one usunięte. Każdorazowo ze wszystkich pudełeczek wysiewano od 6—9 kulek przenosząc przy pomocy jałowej ezy po jednej kulce na płytki z podłożem stałym i do bulionu cukrowego. Po rozmrożeniu się kulki materiał rozprowadzano dokładnie po powierzchni pożywki ażeby uzyskać oddzielne policzalne kolonie, które później posłużyły do identyfikacji szczepów, a również do porównawczych ilościowych zestawień intensywności zakażenia kulek w badanych odstępach czasu. Wszystkie czynności związane z przygotowaniem kulek i posiewami wykonywane były w wyjałowionym boksie.

### Wyniki

Badania bakteriologiczne wymazów pobranych z wewnętrznych powierzchni ścian i dna

kontenera po usunięciu pudełek zawierających kulki oraz azotu, wykazały we wszystkich posiewach bezpośrednich obecność szczepów bakteryjnych, które wchodziły w skład zakażonych kulek potwierdzających uzyskanie zakażonego osadu.

Posiewy kontrolne rozcieńczalnika oraz kulek jałowo przygotowanych wykonane losowo przed włożeniem ich do kontenera zawierającego zakażony osad wypadły ujemnie na podłożach stałych i namnażających.

Posiewy kontrolne azotu wykonane przed napełnieniem kontenera zawierającego zakażony osad wykazały po namnożeniu pojedyncze kolonie z rodzaju *Micrococcus* w 2 posiewach na 6 wykonanych natomiast wszystkie posiewy bezpośrednie wypadły ujemnie.

Posiewy azotu z doświadczalnego kontenera zawierającego zakażony osad i jałowo przygotowane kulki każdorazowo wykazywały na podłożach stałych i namnażających od jednego do trzech szczepów łącznie. Wyniki posiewów jałowo przygotowanych kulek wykonane w różnych okresach czasu po przetrzymaniu ich w kontenerze zawierającym zakażony osad przedstawia tab. 1. Procent dodatnich izolacji wzrasta tu z 80 po 2 godzinach do 99% po 24 godz., a po 4 dniach wynosi 100%. Przeciętna ilość bakterii wyosobnionych z poszczególnych kulek zwiększa się od 27,5 izolowanych po 2 godzinach do 68 po 24 godzinach następnie spada do 56 po 4 dniach i znów po 9 dniach wzrasta do 85 bakterii stwierdzanych przeciętnie w jednej kulce.

Izolacje szczepów bakteryjnych pochodzących z osadu w posiewach z poszczególnych kulek są uwidocznione w tab. 2. Zwraca tu uwagę wędrowka szczepów bakteryjnych. Po 6 godzinach najwięcej bo 65% kulek było zakażonych 2 szczepami równocześnie, z 30% kulek izolowano 3 szczepy, a jeden szczep stwierdzono tylko w 5% kulek. Po 24 godzinach 2 szczepy stwierdzono tylko w 33% kulek natomiast ilość kulek, gdzie wyhodowano tylko 1 szczep zwiększyła się dwukrotnie, a 3 szczepy łącznie

Tab. 1. Posiewy kulek jałowo przygotowanych po przetrzymywaniu ich w ciekłym azocie w kontenerze zawierającym zakażony osad

Czas posiewu od włożenia kulek do kontenera	Posiewy na podłoża stałe Ilość badanych kulek				Przeciętna liczba kolonii izolowanych z kulki	Posiewy na podłoża namnażające Ilość badanych kulek			
	Ogólnie	Z dodatnim wynikiem	Z ujemnym wynikiem	% dodatnich posiewów		Ogólnie	Z dodatnim wynikiem	Z ujemnym wynikiem	% dodatnich posiewów
2 h	300	240	60	80	(27,5)	100	94	6	94
4 h	300	246	54	82	(30,9)	100	95	5	95
6 h	300	264	39	88	(44,2)	100	99	1	99
24 h	300	297	3	99	(68)	100	100	0	100
4 dni	100	100	0	100	(56)	50	50	0	100
9 dni	100	100	0	100	(86)	50	50	0	100

wyosobniono z 57% kulek. Wyniki przedstawione w tab. 1 i 2 dotyczą kulek zamrożonych w ciekłym azocie. Posiewy kulek umieszczonych ponad poziomem azotu w jego parach, wykonane po 2, 4, 6 i 24 godzinach nie wykazały dodatniej izolacji.

Tab. 2. Liczba szczepów wyosobnionych z poszczególnych kulek w różnych odstępach czasu

Czas *) posiewu	Ogólna liczba kulek zakażonych	Liczba kulek zakażonych		
		jednym szczepem	dwoma szczepami	trzema szczepami
do 6 h	750	38 5%	487 65%	225 30%
powyżej 24 h	297	29 10%	97 33%	169 57%
po 4 i 6 dniach	200	14 7%	20 10%	166 83%

\*) = po umieszczeniu kulek w kontenerze zawierającym zakażony osad.

### Omówienie

Przeprowadzone doświadczenie potwierdza, że podczas przechowywania nasienia bezpośrednio w ciekłym azocie wewnątrz kontenera z czasem odkłada się osad, który po usunięciu zawartości kontenera i po usunięciu azotu pozostaje na jego wewnętrznej powierzchni.

O ile w kontenerze znajdowało się równocześnie odpowiednie źródło zakażenia, utworzony osad będzie zawierał uzyskane z tego źródła zarzaki a po usunięciu tegoż źródła z kontenera stanie się ich rezerwuarem oraz będzie kontynuował proces zakażenia czystego świeżo wprowadzonego materiału.

W przedstawianych warunkach doświadczalnych 80% jałowo przygotowanych kulek uległo zakażeniu w ciągu 2 godzin od włożenia ich do kontenera zawierającego zakażony osad, przy czym średnia ilość bakterii wyniesionych na powierzchnię każdej kulki wynosiła ok. 27. Jeżeli wziąć pod uwagę wyniki posiewów na podłożach namnażających to w wymienionym okresie czasu 95% jałowych kulek zetknęło się trwale z zarazkiem.

Porównując wyniki poprzednich badań nad możliwością przenoszenia się bakterii z kulek zakażonych na jałową drogą ciekłego azotu (3, 4, 5, 6, 7) z wynikami obecnych badań należy podkreślić, że dla nasienia przechowywanego w ciekłym azocie zakażony osad w kontenerze jest bardziej niebezpieczny niż zakażone nasienie w kontenerze wolnym od osadu. W cytowanym doświadczeniu, ażeby wywołać zakażenie kulek jałowych w jałowym kontenerze trzeba było użyć wysokich koncentracji zarazków w kulkach które były źródłem infekcji. Liczby bakterii zbliżone do stwierdzanych zwykle w nasieniu zdrowych buhajów przechowywanym w ciekłym azocie nie wystarczały do zakażenia jałowo przygotowanych kulek, jeżeli proces przebiegał w kontenerze wolnym od osadu.

W procesie zakażenia nasienia w środowisku ciekłego azotu nie bez znaczenia wydaje się sposób w jaki komórka bakteryjna jest związana z podłożem, z którego rozpoczyna wędrówkę w stronę jałowej kulki nasienia. Drobnoustroje zamknięte w zamrożonej kulce nasienia muszą najpierw uwolnić się od azotu prawdopodobnie przez oderwanie się małych cząsteczek z powierzchni kulki. W przeciwieństwie do tego osad na dnie i ścianach kontenera składa się z oddzielnych, luźnych cząsteczek zamrożonego materiału, które mogą być przeniesione przez będący w ciągłym ruchu ciekły azot a jego nasycenie drobnoustrojami będzie o wiele większe niż w kontenerze wolnym od osadu, a zawierającym nawet znaczne ilości zakażonego nasienia.

Wyniki przedstawione w tab. 1 i 2 mogłyby świadczyć o jakiejś wędrówce bakterii w środowisku ciekłego azotu. O ile zwiększenie się ilości szczepów stwierdzanych w poszczególnych kulkach może być wynikiem dokażania ich z osadu to zmniejszenie się ilości szczepów izolowanych z każdej kulki mogłoby być dowodem zmywania bakterii naniesionych na powierzchnię kulki i ich przemieszczania się.

Wyniki przedstawianych badań bazują na warunkach eksperymentalnych w jakich osad został nagromadzony — wysoka koncentracja zarazków w kulkach będących źródłem zakażenia, dość długi okres gromadzenia osadu. Istnieje pytanie w jakim stopniu możemy odnieść powyższe wyniki do codziennej praktyki sztucznego unasienniania, jeżeli unikamy konserwowania w ciekłym azocie nasienia zakażonego. Może się jednak zdarzyć w pewnych określonych warunkach, że nasienie pochodzące od zdrowych dawców, pobrane i przygotowane w sposób właściwy, wolne od zarazków patogennych i innych, a umieszczone tylko na okres transportu, w kontenerze zawierającym zakażony osad dostanie się na miejsce przeznaczenia, którym będzie bank nasienia lub punkt inseminacyjny z balastem uzyskanych drobnoustrojów, a niebezpieczeństwo ich obecności określi rodzaj i patogenność zarazka.

Przyczyną tworzenia się zakażonego osadu w kontenerach może być nie tylko zakażony materiał biologiczny przechowywany bezpośrednio w ciekłym azocie ale również sam ciekły azot może wnosić zakażone cząsteczki z pojemników i sprzętu jeżeli te są narażane na zanieczyszczenie drobnoustrojami, a warunki dla ciągłego uzupełniania takiego osadu istnieją dzięki odparowywaniu azotu. Zakażony osad może być niebezpieczny nie tylko dla nasienia lub innego materiału biologicznego przechowywanego bez osłony w ciekłym azocie. W kontenerze drobnoustroje mogą odkładać się na powierzchni fiolek, słomek i innych opakowań konserwowanego materiału i tą pośrednią drogą mogą zostać wyniesione na zewnątrz i nawet osiągnąć chroniony materiał.

W praktyce inseminacyjnej wydaje się wska-

zana ze względów profilaktycznych częsta wymiana kontenerów będących w użyciu. Przez wymianę należy rozumieć szybkie przeniesienie całej zawartości każdego pojemnika do wypełnionego azotem odpowiednio przygotowanego kontenera, w którym nasienie pozostanie już do czasu następnej wymiany kontenerów. Rotacja kontenerów wymaga jednakże odpowiedniego ich przygotowania i zapewnienia maksimum jałowości. Zagadnienie wyjaławiania kontenerów będzie przedmiotem oddzielnej publikacji.

W produkcji kontenerów należałoby lansować modele o gładkiej powierzchni wewnętrznej dna z ruchomymi dającymi się przesuwać odstępnikami (spacer), które zamontowane trwale sprzyjają odkładaniu się osadu i utrudniają dezynfekcję.

#### Wnioski

1. W kontenerach przechowujących obficie zakażone nasienia z biegiem czasu gromadzi się osad zawierający te same drobnoustroje co w nasieniu.

2. W określonych warunkach zakażony osad może doprowadzić do infekcji przechowywanych kulek nasienia już w ciągu 2 godz. od umieszczenia ich w kontenerze.

3. Zakażenie jałowych kulek od osadu następuje o wiele szybciej niż w jałowym kontenerze od zakażonego nasienia.

4. Należy przerywać proces tworzenia się osadu przez częstą wymianę kontenerów.

5. Do produkcji kontenerów należałoby wprowadzać modele o gładkiej powierzchni wewnętrznej dna lub z ruchomymi odstępnikami.

#### Piśmiennictwo

1. Lorrmann W.: Versuche zur Keimübertragung bei der Tiefgefrierkonservierung von Samen in Pelletform. Vet. Med. Diss. Hannover, 1967.
2. Müller W.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 4, 64, 1968.
3. Piasecka-Serafin M.: Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 108, 207, 497, 1970.
4. Piasecka-Serafin M., Branny J., Wierzbowski S.: Medycyna Wet. 25, 497, 1969.
5. Piasecka-Serafin M., Wierzbowski S.: Fortpfl. Besam. u. Aufzucht d. Haustiere, 6, 365, 1970.
6. Piasecka-Serafin M.: Streszczenia prac na XVII Zjazd PTM, 1970.

7. Piasecka-Serafin M.: Streszczenia prac na XVII Zjazd PTM, 1970.
8. Steeg L.: 6th Int. Congr. Animal Reprod. and A. I. Resumes, 206, 1968.

Adres autora: dr Monika Piasecka-Serafin, Kraków, ul. Brodowicza, 13a m. 1.

Пясецка-Сэрафин М. — Влияние накапливающегося в контейнерах осадка на заражение пеллетированного семени хранимого в жидком азоте (−196°).

Zarażený osadok получали помещая в стерильный контейнер стерильные шарики и шарики зараженные тремя разными бактериальными штаммами (в отдельных коробочках с отверстиями) сроком на три года. Результаты заражения проводили периодически. По истечении 3 лет шарики и азот удаляли. В осадке установили присутствие всех трех штаммов бактерий входящих в состав зараженных шариков. Установили что стерильные шарики приготовленные из разбавителя семени, помещенные в контейнер содержащий зараженный азот, были заражены уже через 2 часа и что зараженный осадок более вредное влияет на стерильность хранимого в жидком азоте (−196°) семени, чем присутствие в контейнере без осадка зараженных шариков семени.

Piasecka-Serafin M. — The effect of the sediment accumulated in containers on the infection of pelleted semen stored in liquid nitrogen (−196°C).

Investigations were carried out to determine the effect of the sediment accumulated in the container holding infected semen upon the infection of the uncontaminated pelleted semen being preserved in liquid nitrogen (−196°C). In order to obtain the infected sediment, sterile and infected pellets with three different bacterial strains were placed separately into perforated boxes. The boxes were put into a sterile container and left there for 3 years; bacteriological control was being performed periodically. After this period both the pellets and liquid nitrogen were removed from the container. Bacteriological examination of the sediment revealed the bacterial strains present in the infected pellets. Sterile pellets prepared of a semen diluent became infected within 2 hrs after placing them in a container holding the infected sediment. The degree of pellet infection (qualitative and quantitative) was examined at different periods. The results of our investigations showed that the infected sediment was more dangerous for the semen stored in liquid nitrogen than the contaminated semen in a container free of sediment.

STANISŁAW KOZŁOWSKI, IRMGARDA KOZŁOWSKA

Koszalin

## Drobnoustroje izolowane z poronionych płodów bydłych na terenie woj. koszalińskiego w latach 1969-1970

Drobnoustroje wywołujące ronienia u krów należą do najważniejszych czynników hamujących rozwój pogłowia bydła. W NRD van Ulzen (39) stwierdził drobnoustroje w 33,8% poronionych płodów, Weikl (40) w 30,1%, Beerwerth i Münker (2) w 18,2%; w CSRS Kolář (11) w 24,3%, Král i Kolář (12) w 15,6%, Gilka i Pejše (6) w 34,8% badanych płodów bydłych. Oprócz czynników swoistych (*Brucella abortus*,

*Vibrio foetus*, *Trichomonas foetus*) szereg autorów zwraca uwagę na ronienia u bydła powodowane przez drobnoustroje nieswoiste, a szczególnie: *Leptospira pomona* (25), *L. sejroë* (22), *L. grippotyphosa* (41), *Salmonella dublin* (5, 16, 39), *S. typhimurium* (30, 37), *S. brandenburg*, *S. choleraesuis* (23), *Listeria monocytogenes* (11, 30, 36), *Corynebacterium pyogenes* (11, 39, 40), *Mycobacterium tuberculosis* (6,