

BARBARA TRĘBUSIEWICZ, LECH WARTENBERG, JERZY PRÉS

Trwałość składnika tłuszczowego koncentratu paszowego „Celat” w różnych warunkach przechowywania

Z Instytutu Higieny Produktów Zwierzęcych
Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

Z Instytutu Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej
Wydziału Zootechnicznego AR we Wrocławiu

W celu zwiększenia wartości energetycznej pasz w żywieniu zwierząt wykorzystuje się tłuszcze pochodzenia zwierzęcego, tłuszcze roślinne, syntetyczne kwasy tłuszczowe oraz kwasy tłuszczowe parafinacyjne, dodawane w ustalonych ilościach, w stosunku i mieszaniu (3, 4, 7, 11, 17, 19, 23, 24). Dodatek tłuszczu powoduje obniżenie zużycia pasz o około 10—20% i zwiększenie przyrostu ciężaru ciała o 5—10% (4, 17, 19).

Określoną część dodawanych tłuszczów powinny stanowić niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT), przede wszystkim kwas linolowy. Wykazano (10, 11, 13), że skład chemiczny i stosunek kwasów tłuszczowych wyraźnie wpływa na większą efektywność wchłaniania i przyswajania tłuszczów. Tłuszcze bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe ulegają jednak utlenieniu i dalszemu rozkładowi. Temu zjawisku przeciwdziała dodatek do tłuszczu osłony przeciwutleniacza, który chroni jednocześnie przed rozkładem witaminę A, karoteny i witaminę F (9, 13, 22, 24).

Od 1975 r. rozpoczęto w kraju produkcję koncentratu tłuszczowego o zastrzeżonej nazwie Celat (21). Jest to sypki preparat, którego technologia oparta jest na oryginalnej metodzie wykorzystania wycierki ziemniaczanej termicznie preparowanej, która dobrze chłonie tłuszcz, zachowując pożądaną sypkość preparatu jako składnika mieszanki paszowej (20). Skład i wymagania chemiczne koncentratu tłuszczowego ustala Norma Branżowa (14). Koncentrat tłuszczowy Celat dodaje się do mieszanki treściwej dla prosiąt (2%) oraz do mieszanki stosowanych w tuczu przemysłowym świń (mieszanki typu Kołbacz).

Wzrost udziału tłuszczu jako składnika mieszanki paszowej sprowadza jednak niebezpieczeństwo szybszego rozkładu frakcji tłuszczowej mieszanki, a co za tym idzie obniżenie wartości odżywczej takiego produktu paszowego. Równocześnie bowiem z rozkładem tłuszczu ulegają zniszczeniu witaminy A i F oraz obniża się w rezultacie utleniania poziom NNKT. Spadek zawartości lub nawet zupełnie zniszczenie tych składników, które są regulatorami w przemianie materii, może dać w konsekwencji gorsze wyniki produkcyjne w tuczu niektórych gatunków zwierząt gospodarskich. Niedobór lub brak witaminy F w karmie, która jest wrażli-

wa na utlenianie w obecności rozkładającego się tłuszczu, powoduje zwiększone zapotrzebowanie organizmu zwierzęcego na ten składnik (12, 13, 17). March i wsp. (8) donieśli, że dodatek utlenionego oleju rybnego w paszy wzmacnia zapotrzebowanie kurcząt na kwas foliowy. Niedobory NNKT w żywieniu kurcząt wywołują również zaburzenia wzrostu (cyt. za 5). Wskazuje się, że spadek zawartości witaminy A, karotenów oraz witaminy F w paszy może wpływać na gorsze wyniki produkcyjne w tuczu kurcząt rzeźnych (6), a na pewno na obniżenie zapasów ustrojowych obu tych witamin (12, 26).

Uwzględniając przeto podstawowe znaczenie czynnika zdrowotno-żywnościowego w produkcji zwierzęcej uznano za celowe określenie trwałości składnika tłuszczowego koncentratu Celat, przechowywanego w różnych warunkach. Badania takie są tym bardziej uzasadnione, że produkcja koncentratu tłuszczowego wzrosła w latach następnych i będzie on jednym z podstawowych komponentów do natłuszczenia mieszanek przemysłowych dla zwierząt.

Materiał i metody

Koncentrat tłuszczowy Celat wyprodukowany w Wytwórni Pasz w T pochodził z jednej partii produkcyjnej. Podstawowy skład chemiczny produktu był następujący: woda — 7,26%, tłuszcz surowy — 49,23%, sucha pozostałość — 43,51%. Zgodnie z wstępnym założeniem materiał podzielono na cztery grupy doświadczalne, biorąc pod uwagę wpływ światła, temperatury, dodatku (0,05%) lub brak przeciwutleniacza (BHT). W związku z tym ostatnim czynnikiem każdą grupę podzielono na dwie podgrupy oznakowane a_1 , a_2 , b_1 , b_2 itd.

Grupa I

a_1 — preparat przechowywany w chłodziarce w słoju szklanym (temp. 2—3°),

a_2 — preparat z dodatkiem BHT przechowywany w chłodziarce w słoju szklanym (temp. 2—3°),

Grupa II

b_1 — preparat przechowywany w słoju szklanym w pomieszczeniu o temp. 20—25°, bez dostępu światła,

b_2 — preparat z dodatkiem BHT przechowywany w słoju szklanym w pomieszczeniu o temp. 20—25° bez dostępu światła,

Grupa III

c_1 — preparat przechowywany w słoju szklanym w pomieszczeniu o temp. 20—25°C, wystawiony na działanie światła słonecznego,

c_2 — preparat z dodatkiem BHT przechowywany w słoju szklanym w pomieszczeniu o temp. 20—25°C, wystawiony na działanie światła słonecznego,

Grupa IV

d_1 — preparat przechowywany w kuwecie porcelanowej w warstwie grub. ok. 4 cm, w pomieszczeniu

o temp. 20—25°C, wystawiony na działanie światła dziennego,

d₂ — preparat z dodatkiem BHT przechowywany w kuwecie porcelanowej w warstwie grub. ok. 4 cm w pomieszczeniu o temp. 20—25°C wystawiony na działanie światła dziennego.

Surowy tłuszcz z koncentratu otrzymywano przez ekstrakcję na zimno eterem etylowym wolnym od nadtlenków (15). W ekstrakcie eterowym oznaczano zawartość tłuszczu metodą wagową. W określonej objętości ekstraktu oznaczano liczbę kwasową, liczbę nadtlenkową metodami wg norm (16), stopień rozkładu tłuszczu metodą z kwasem 2-tiobarbiturowym w modyfikacji Dzikowskiego (2), sumę związków karbonylowych metodą wg Chipoutla (1), liczbę zmydlenia oraz stopień refrakcji tłuszczu metodami wg norm (16).

W terminach 0, 21, 42, 63, 80 i 104 dni pobierano próbki materiału z całej objętości słoja lub z określonej powierzchni kuwety i postępowano jak wyżej.

Doświadczenie IV rozpoczęto z opóźnieniem w 42 dniu badań. Okres, w którym określano trwałość preparatu, wynosił 62 dni.

Omówienie wyników

Wyniki zebrano w tab. 1. W koncentracie bez dodatku BHT przechowywanym w temp. chłodziarki oraz w temp. 20—25°C bez dostępu światła stwierdzono jedynie nieznaczny postęp zmian chemicznych w tłuszczu, przy czym bardziej jednak wzrosły parametry stopnia utleniania w preparacie przechowywanym w temp. 20—25°. Ekstynkcja w próbie z KTB oraz suma związków karbonylowych wynosiły odpowiednio: 0,295 i 14,1 oraz 0,295 i 24,4. Liczba nadtlenkowa frakcji tłuszczowej kon-

centratu tych grup nie zmieniła się w ciągu całego okresu przechowywania. W podgrupach a₂ i b₂ koncentratu (osłona przeciwutleniacza) liczba nadtl., KTB, suma związków karbonylowych wynosiła dla tych podgrup odpowiednio 0,6; 0,260; 12,9 oraz 1,5; 0,260; 18,3, a więc wartości te były niższe aniżeli w grupach a₁ b₁.

W tłuszczu koncentratu III grupy doświadczalnej, w podgrupie c₁ już po około 21 dniach przechowywania wskaźniki świeżości tłuszczu bardzo wzrosły, w tłuszczu preparatu z dodatkiem BHT (c₂) były nieco niższe. W 104 dniu doświadczenia wskaźniki utleniania tłuszczu obu tych podgrup różniły się wysoko istotnie w porównaniu do tych wartości w tłuszczu grupy II koncentratu. Również i w podgrupie c₂ (dodatek BHT) zachodził intensywny proces utleniania tłuszczu, co nie wystąpiło w tłuszczu innych podgrup preparatu chronionych przeciwutleniaczem.

W preparacie rozłożonym w cienkiej warstwie w podgrupie d₁ w 63 dniu doświadczenia liczba nadtlenkowa wynosiła 17,3 natomiast w preparacie podgrupy d₂ była równa 7,0. Wzrosły również w podgrupie d₁ pozostałe wskaźniki zmian oksydacyjnych tłuszczu. Wskaźniki świeżości frakcji tłuszczowej podgrupy d₂ koncentratu chronionej antyoksydantem — były niższe.

W przebiegu całego doświadczenia liczba kwasowa tłuszczu wszystkich podgrup koncen-

Tab. 1. Zmiany chemicznych wskaźników świeżości frakcji tłuszczowej koncentratu paszowego „Celat” w różnych warunkach przechowywania

Warunki przechowywania			Liczba kwasowa mg KOH/g						Liczba nadtlenkowa ml 0,002 Na ₂ S ₂ O ₃ /g						Próba z KTB (ekstynkcja)					
			Terminy analiz w dniach																	
			0	21	42	63	80	104	0	21	42	63	80	104	0	21	42	63	80	104
Grupa I chłodziarka temp. 2-3°C	a ₁	bez dod. BHT	2,3	2,7	2,6	2,6	2,6	3,5	0	0	0	0,3	0,4	1,0	0,100	0,125	0,150	0,221	0,230	0,295
	a ₂	z dod. BHT	2,3	2,4	2,4	2,3	2,4	4,0	0	0	0	0,2	0,4	0,5	0,100	0,115	0,130	0,185	0,225	0,260
Grupa II pomieszczenie zaciemnione temp. 20-25°C	b ₁	bez dod. BHT	2,3	2,5	2,4	2,4	2,3	3,4	0	0	0	0,4	0,6	1,0	0,100	0,135	0,170	0,220	0,260	0,295
	b ₂	z dod. BHT	2,3	2,4	2,0	2,2	2,2	3,2	0	0	0	1,2	0,8	1,5	0,100	0,130	0,140	0,220	0,245	0,260
Grupa III pomieszczenie nasłonecznione temp. 20-25°C	c ₁	bez dod. BHT	2,3	2,3	2,3	2,4	2,4	3,5	0	15,5	22,2	24,7	30,6	42,2	0,100	0,290	0,290	0,370	0,480	0,520
	c ₂	z dod. BHT	2,3	2,2	1,9	2,1	2,1	4,5	0	13,1	16,5	20,5	27,0	35,5	0,100	0,190	0,220	0,280	0,375	0,520
Grupa IV pomieszczenie nasłonecznione temp. 20-25°C (prep. w warstwie)	d ₁	bez dod. BHT	-	-	2,3	2,4	2,3	4,0	-	-	5,3	8,1	10,0	17,3	-	-	0,115	0,140	0,310	0,430
	d ₂	z dod. BHT	-	-	2,1	2,2	2,3	3,1	-	-	3,3	3,5	3,9	7,0	-	-	0,100	0,130	0,205	0,420

Warunki przechowywania			Suma związków karbonylowych mN/kg						Liczba zmydlenia mg KOH/g						n 40°C					
			Terminy analiz w dniach																	
			0	21	42	63	80	104	0	21	42	63	80	104	0	21	42	63	80	104
Grupa I chłodziarka temp. 2-3°C	a ₁	bez dod. BHT	3,8	6,7	9,1	12,3	12,7	14,1	178,7	-	171,6	-	189,5	-	1,4712	-	1,4700	-	1,4688	-
	a ₂	z dod. BHT	3,8	4,7	5,2	10,8	10,9	12,9	178,7	-	172,5	-	178,5	-	1,4712	-	1,4682	-	1,4679	-
Grupa II pomieszczenie zaciemnione temp. 20-25°C	b ₁	bez dod. BHT	3,8	6,2	9,7	12,1	12,6	24,4	178,7	-	161,2	-	182,3	-	1,4712	-	1,4695	-	1,4682	-
	b ₂	z dod. BHT	3,8	4,8	7,4	10,6	11,0	18,3	178,7	-	166,9	-	149,3	-	1,4712	-	1,4695	-	1,4680	-
Grupa III pomieszczenie nasłonecznione temp. 20-25°C	c ₁	bez dod. BHT	3,8	20,0	24,6	26,8	29,3	40,9	178,7	-	170,9	-	179,7	-	1,4712	-	1,4697	-	1,4688	-
	c ₂	z dod. BHT	3,8	17,3	21,3	23,9	26,5	35,2	178,7	-	174,8	-	171,1	-	1,4712	-	1,4696	-	1,4680	-
Grupa IV pomieszczenie nasłonecznione temp. 20-25°C (prep. w warstwie)	d ₁	bez dod. BHT	-	-	11,2	11,6	11,6	11,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	d ₂	z dod. BHT	-	-	11,2	11,6	11,6	11,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

20, 41, 63 i 82 dzień, doświadczenie rozpoczęto po upływie 1 miesiąca od pozostałych doświadczeń.

tratu tylko nieznacznie wzrosła; nie wystąpiły również między poszczególnymi podgrupami zasadnicze różnice, wskazujące na nasilenie wielkości zmian hydrolitycznych tłuszczu.

Przedstawione wyniki obrazują dynamikę zmian oksydacyjnych składnika tłuszczowego koncentratu Celat. Na podstawie analizy zmian poszczególnych parametrów w przyjętych terminach badań można stwierdzić, że produkt w określonych warunkach przechowywania, tzn. albo w obniżonej temperaturze i w ciemności, a nawet w temp. 20—25°, ale również bez dostępu światła charakteryzuje się wysoką trwałością. W koncentracie z dodatkiem BHT, w identycznych warunkach przechowywania, tłuszcz był jeszcze bardziej stabilny. Z kolei w drastycznych warunkach napromieniowania i podwyższonej temperatury preparat ulegał bardzo szybko zjełczeniu oksydacyjnemu. Również i w takich warunkach bariera ochronna przeciwutleniacza szybko załamywała się i proces utleniania przebiegał potem intensywnie.

Wyraźnie skróconą trwałość frakcji tłuszczowej w takich okolicznościach da się wytłumaczyć cechami fizyko-chemicznymi preparatu. Częsteczki tłuszczu są „zawieszony” na wysuszonych i sproszkowanych wycierkach ziemniaczanych, a to znacznie „rozwiąza” powierzchnię tłuszczu, tym samym zwielokrotniając jego kontakt ze światłem i tlenem powietrza. W warunkach przechowywania sprzyjających autooksydacji należy więc liczyć się z szybkim rozkładem tłuszczu, tym bardziej, że znaczny odsetek preparatu stanowią tłuszcze zawierające nienasycone kwasy tłuszczowe.

Na marginesie przeprowadzonych badań należy stwierdzić, że określenie trwałości koncentratu już jako komponentu mieszanki treściwej nie jest możliwe, bowiem wydzielenie preparatu z sypkiej masy mieszanki paszowej technicznie nie jest do przeprowadzenia. Wyciąg eterowy surowego tłuszczu z paszy treściwej natłuszczonej jest mieszaniną tłuszczu „wprowadzonego” i tłuszczu „rodzimego” mieszanki wraz ze wszystkimi innymi substancjami, wymywanymi przez rozpuszczalnik. Obraz zmian chemicznych tłuszczu byłby więc wypadkową zmian obu frakcji tłuszczowych.

Wskazywaliśmy również w innym miejscu (25) na występujące trudności natury analitycznej określenia stopnia rozkładu czystych glicerydów w surowym tłuszczu wyciągu eterowego, złożonego przecież z różnych składników roślinnych i zwierzęcych. Obraz przemian chemicznych tłuszczu, tak hydrolitycznych, jak i oksydacyjnych, jest maskowany i komplikowany reakcjami innych składników chemicznych paszy, co zamazuje rzeczywisty obraz zmian rozkładczych tłuszczu, np. z powyższych względów nie nadaje się zupełnie do takich oznaczeń jakościowa barwna próba Kreisa. Stopień kwasowości jest również niepewnym parametrem do oceny świeżości frakcji surowego

tłuszczu mieszanek (25), a tym bardziej mieszanek natłuszczanych. Tłuszcz dodany nie ulega bowiem względnie ulega bardzo wolno lipolizie, jak np. w koncentracie tłuszczowym Celat, równolegle natomiast rośnie kwasowość tłuszczu komórkowego rozdrobnionych komponentów roślinnych (18). Wielkość stopnia hydrolizy obu frakcji tłuszczowych jest więc zawsze wypadkową tego procesu, jak również kwasnego oddziaływania innych substancji chemicznych.

Wnioski, jakie nasuwają się z powyższego doświadczenia dowodzą, że w niewłaściwych warunkach magazynowania mieszanek natłuszczanych preparatem Celat należy liczyć się z szybszym rozkładem oksydacyjnym frakcji tłuszczowej. Zepsucie tego składnika paszowego obniża wartości odżywcze produktu pośrednio przez zanik składników niezbędnych dla organizmu, co w rezultacie stwarza możliwość pogorszenia wyników produkcyjnych.

Piśmiennictwo

1. Dzikowski J.: Roczniki PZH 11, 461, 1956.
2. Budstowski J.: Metody analizy żywności. WPLS 1967.
3. Faruga A.: Drobiarstwo 1, 6, 1972.
4. Glaps J.: Zeszyty Nauk. ZZD Czechnica 1, 2, 1972.
5. Gratzl E., Köhler H.: Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten, rozdz. Ernährungstörungen. F. Enke Verlag, Stuttgart 1968.
6. Grabowski T., Mazanowski A., Uhażcowa Z.: Drobiarstwo 1, 7, 1972.
7. Helmersen M.: Przem. Spoż. 5, 15, 1965.
8. March B. E., Biely J.: Poult. Sci. 34, 39, 1955.
9. Matyka S., Stawinski P.: Biul. Inf. Przem. Pasz. 3—4, 40, 1972.
10. Mohr S.: Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 5, 298, 1968.
11. Niesar K. H.: Kraftfutter 42, 415, 1959.
12. Niesar K. H.: Fette, Seifen, Anstrichmitt. 6, 525, 1962.
13. Niesar K. H.: Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 20, 187, 1965.
14. Norma Branżowa: BN-74/9164-10 Koncentrat tłuszczowy „Celat”.
15. PN-76/R-64753 Pasze, oznaczanie zawartości tłuszczu surowego.
16. PN-73/A-85803 Tłuszcze zwierzęce jadalne. Metody badań.
17. Ryś R.: Nowe Rolnictwo 13, 13, 1971.
18. Thomke S.: Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 27, 31, 1971.
19. Tyłzanowski J.: Biul. Inf. Przem. Pasz. 3—4, 5, 1974.
20. Tyłzanowski J.: Biul. Inf. Przem. Pasz. 3, 23, 1975.
21. Tyłzanowski J., Zernicki W.: Biul. Inf. Przem. Pasz. 4, 54, 1975.
22. Tyłzanowski J.: Biul. Inf. Przem. Pasz. 1, 20, 1975.
23. Tyłzanowski J.: Gosp. mies. 11, 19, 1976.
24. Vanshoubroek F.: The utilization of fats in Animal Nutrition (cattle, pigs, poultry). Biul. Świat. Kongr. Żyw. Madryt, 1936.
25. Wartenberg L., Monkiewicz J.: Medycyna Wet. 23, 515, 1967.
26. Wartenberg L., Trębusiewicz B.: Medycyna Wet. 30, 661, 1974.

Adres autora: dr Barbara Trębusiewicz, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław.

Трембусевич Б., Вартенберг Л., Пресь Е. — Устойчивость жирового компонента кормового концентрата „Celat” в различных условиях хранения.

На основании проведенных исследований констатировали, что жировой концентрат „Celat”, выпускаемый в Польше для калорийного обогащения концентрированных кормов, отличается значительной устойчивостью в определенных условиях складирования. После свыше 3-месячного хранения в темп. 20—25° в темноте и в темп. ок. 4° также без доступа света показатели свежести жира указывали на очень замедленные оксидационные и гидролитические изменения жировой фракции. Хранение в условиях повышенной температуры и солнечного облучения сокращает устойчивость жирового компонента концентрата. В тех же условиях заслон антиокислителя не играет защитной роли.

Trębusiewicz B., Wartenberg L., Pres J. — **Stability of a fat component of a fodder concentrate „Celat” in various conditions of storage.**

It was found that a fat concentrate „Celat”, produced in Poland for caloric enrichment of concentrate revealed a remarkable stability in definite storage con-

ditions. After above 3 months storage at 20—25°C and 4°C in darkness, the indices of fat freshness pointed to very slow oxidative and hydrolytic changes of fat fraction. Storage in raised temperature and sunlight diminished stability of a fat component of concentrate. In this conditions the shield of antioxidant did not play any protective role.

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

ZDZISŁAW SMORAĞ, STEFAN WIERZBOWSKI, EDWARD WIERZCHOŚ,
WIESŁAW KARETA, BARBARA GAJDA

Wyniki transplantacji zamrożonych zarodków owiec

Z Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt Instytutu Zootechniki, Balice k. Krakowa

Zamrażanie zarodków ssaków — poza ogólnobiologicznym aspektem, jakim jest możliwość okresowego zatrzymania rozwoju organizmu, a następnie przetrzymywania go w stanie zamrożonym — otwiera równocześnie możliwość znacznych uproszczeń w zakresie transplantacji. W praktyce transplantacji u bydła stosuje się przetrzymywanie zarodków w temperaturze pokojowej. W warunkach eksperymentalnych przetrzymywano zarodki owcy do 10 dni (1). Natomiast zarodki krowy przechowuje się na skalę doświadczalną przez okres około 2 dni (3, 9). Z kolei konieczność stosowania synchronizacji cyklu płciowego dawcy i biorcy stwarza szereg dodatkowych utrudnień technicznych przy bardzo ograniczonym czasie przechowywania zarodków poza organizmem. Z tego powodu badania nad przechowywaniem zarodków w stanie zamrożonym mają tak istotne znaczenie dla możliwości stosowania transplantacji w praktyce.

Pierwsze cielę po transplantacji zamrożonego zarodka urodziło się w 1973 r. (11), a kilka następnych urodziło się jedynie w Cambridge i w Australii (2, 10). Pierwsze jagnięta po transplantacji zamrożonych zarodków uzyskano także w Cambridge (7, 8), a następnie w Australii (2). Uzyskano tam również pierwsze wykoty kóz.*)

Pierwsze transplantacje zamrożonych zarodków owcy autorzy przeprowadzili w 1975 r. Jednak po transplantacji u żadnej z 4 biorczyń, którym transplantowano 6 zarodków, ciąża się nie rozwinęła.

Materiał i metody

a) Przygotowanie zwierząt i uzyskanie zarodków.

Jako dawczyni zapłodnionych komórek jajowych używano owiec rasy merynos i cakiel w wieku od 3 do

7 lat. Owce były przygotowywane do superowulacji, a następnie kryte lub inseminowane trykami rasy merynos lub karakuł.

Superowulację wywoływano podając 1000 j.m. PMSC w 13 dniu cyklu. Po wystąpieniu pierwszych objawów rui podawano i. v. 1000 j.m. HCG. Równocześnie rozpoczęto krycie. Owce były kryte lub inseminowane 2—3 razy w odstępach 8—10 godzin. Zarodniki wypłukiwano pomiędzy 3 a 7 dniem. Jamy brzuszne otwierano w linii białej u zwierząt znajdujących się w stanie pełnej narkozy operacyjnej. Owce były używane 1 lub 2, a w niektórych wypadkach 3 razy. Zarodki zarówno z roku macicy jak i z jajowodu wypłukiwano kierując przepływ płynu od macicy do lejka jajowodu. Płukaniem obejmowano róg macicy od miejsca przyczepu *lig. intercornualae*. Do płukania używano około 20 ml uzupełnionego płynu Dulbecco (6) w temperaturze ok. 37°C. Od pobrania zarodków do rozpoczęcia mrożenia upływały ok. 2 godz. Był to czas potrzebny na wyszukanie, ocenę i pozostałe czynności związane z przygotowaniem do mrożenia.

b) Zamrażanie i rozmrażanie.

Metody zamrażania i rozmrażania zarodków były zbliżone do stosowanych przez Willadsena i wsp. (7, 8). Komórki jajowe po ich uzyskaniu i ocenie morfologicznej przeprowadzano przez kolejno wzrastające stężenia DMSO w uzupełnionym roztworze Dulbecco (6), 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25 i 1,5 M. W każdym z wymienionych stężeń komórki jajowe były przetrzymywane przez 5 min., a w stężeniu 1,5 M pozostawały przez 20 minut. W ostatnim etapie zarodki były umieszczane w szklanych probówkach o wymiarach 0,6×5 cm zawierających ok. 0,2 ml i 1,5 M DMSO w roztworze Dulbecco. Wszystkie te czynności przeprowadzano w temp. 20—24°C. Następnie próbki z zarodkami przenoszono do lodówki o temperaturze 2—4°C na okres 10 minut, a po tym przenoszono na okres 5 min. do łaźni lodowo-wodnej. Następnie próbki przenoszono do łaźni alkoholowej o temp. —6°C. Po 2—3 minutach dokonywano posiewania kryształków lodu (5), po czym pozostawiano je w tej temperaturze na okres dalszych 5 minut. Mrożenie przeprowadzano ze stałą szybkością 0,27°C/min. do temp. —80°C. Po osiągnięciu tej temperatury próbki przekładano do ciekłego azotu, gdzie były przechowywane przez okres ok. 2 miesięcy.

Rozmrażanie przeprowadzano z szybkością 12—14°C/min. Po całkowitym rozmrożeniu, zawartość próbek przenoszono na szkiełka zegarkowe, gdzie wyszukiwano a następnie przeprowadzano ocenę morfologiczną zarodków. Czynności te pochłaniały zazwyczaj

* Szczegółowy przegląd piśmiennictwa obejmującego badania z tego zakresu został opublikowany w *Medycynie Wet.* 32, 210, 1976.