

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

EWA BUKOWICZ

Występowanie drobnoustrojów warunkowo-chorobotwórczych w mrożonym nasieniu buhajów

Zakład Profilaktyki Niepłodności Instytutu Weterynarii Oddział w Poznaniu,
ul. Poznańska 35, 62-020 Swarzędz

Wprowadzenie do szerokiej praktyki inseminacyjnej nasienia mrożonego spowodowało zwrócenie szczególnej uwagi na zagadnienie jego czystości pod względem bakteriologicznym. Za zanieczyszczenia nasienia uważa się występowanie w nim drobnoustrojów warunkowo-chorobotwórczych lub niechorobotwórczych, które mogą pochodzić z dróg moczościowych buhaja, szczególnie z worka napletkowego lub dostawać się do nasienia w czasie jego pobierania, badania, rozrzedzania względnie przechowywania. Pomimo braku jednoznacznej opinii co do roli, jaką odgrywają drobnoustroje warunkowo-chorobotwórcze w płodności nasienia, należy przypuszczać, że nieobojętny jest wpływ toksyn i metabolitów wytwarzanych przez drobnoustroje na wartość biologiczną nasienia.

Debruyne (1), porównując wyniki unasiwienia przy użyciu nasienia zawierającego po pobraniu średnio 322 750 i 4 826 125 bakterii w 1 cm³, stwierdził niepowtarzalność rui w 74,5% po jednorazowym unasiwieniu 23 174 krów nasieniem o niższej zawartości bakterii, zaś w 73,6% po unasiwieniu 2199 krów nasieniem o wyższej zawartości bakterii. Było to nasienie świeże używane w ciągu 48 godz. (1). Podobne obserwacje przeprowadził Króliński, który na podstawie 2557 unasiwień stwierdził tendencje do obniżania się niepowtarzalności rui, w miarę wzrostu liczby bakterii w nasieniu (8). Kondrašov, który zajmował się zagadnieniem zanieczyszczenia nasienia *Pseudomonas aeruginosa*, nie znajdował różnic zacieleń przy użyciu nasienia zakażonego tym drobnoustrojem (5). Ostaszko podał, że 500 drobnoustrojów w 1 cm³ nasienia mrożonego stanowi granicę, po przekroczeniu której płodność kształtuje się poniżej 66% (7).

Stan higieniczny nasienia w aspekcie warunków, w jakich jest ono pobierane, konserwowane i przechowywane wymaga szczególnej uwagi w przypadku gromadzenia go w dużych, stacjonarnych kontenerach. Z badań Piaseckiej-Serafin nad możliwością zakażeń bakteriologicznych nasienia przechowywanego bezpośrednio w ciekłym azocie (nieosłonięte kulki nasienia) wynika, że istnieje możliwość przenosze-

nia drobnoustrojów drogą ciekłego azotu (13). W związku z tym wprowadzenie do kontenera nasienia zawierającego drobnoustroje, może stać się źródłem zakażenia całego zdeponowanego tam nasienia.

Określony, niski poziom zanieczyszczenia nasienia drobnoustrojami jest również jednym z wymogów w międzynarodowym obrocie nasieniem mrożonym. W propozycjach Int. Organization for Standardization, dotyczących wymagań przy międzynarodowym obrocie nasieniem, określono 5000 drobnoustrojów w 1 cm³ nasienia jako wielkość dopuszczalną (4). Stała Komisja Rolna RWPG określiła w 1977 r., że nasienie będące przedmiotem obrotu międzynarodowego nie powinno zawierać więcej niż 500 bakterii w jednej porcji. Za górną dopuszczalną granicę zanieczyszczenia nasienia, zgodnie z Tymczasowymi wytycznymi Ministerstwa Rolnictwa-Departamentu Weterynarii w sprawie oceny warunków sanitarno-higienicznych w stacjach hodowli i unasiwienia zwierząt uważa się 150 000 drobnoustrojów w 1 cm³ nasienia mrożonego oraz 500 000 drobnoustrojów w 1 cm³ nasienia świeżego (16).

Celem niniejszej pracy było określenie ilościowego i jakościowego stopnia zanieczyszczenia bakteriologicznego nasienia mrożonego buhajów znajdujących się w stacjach hodowli i unasiwienia zwierząt.

Material i metody

Materiałem badanym było nasienie mrożone w kulkach 233 buhajów, pochodzących z sześciu stacji hodowli i unasiwienia zwierząt. Stacje te oznaczono symbolami: A-F. Pod względem metodycznym badania przeprowadzono wg instrukcji nr 49 Ministerstwa Rolnictwa-Departamentu Weterynarii z dnia 9 grudnia 1978 roku (3).

Badanie bakteriologiczne nasienia buhajów obejmowało określenie:

— liczby drobnoustrojów metodą posiewu powierzchniowego: 0,1 cm³ nasienia rozcieńczonego roztworem fizjologicznym soli w stosunku 1:10, 1:100, 1:1000 posiewano na płytce z podłożem agarowym z dodatkiem krwi, następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godz., po czym liczono wyrosłe kolonie, — rodzaju drobnoustroju: niewielką ilość nasienia nierozcieńczonego posiewano na podłożu agarowe z krwią, na podłożu Mc Conkeya i na podłożu Edwardsa. Po 48 godz. inkubacji w temp. 37°C wyrosłe ko-

Tab. 1. Drobnoustroje w nasieniu mrożonym buhajów w stacjach unasienniania

Oznaczone parametry	Stacje unasienniania						Ogółem
	A	B	C	D	E	F	
Liczba buhajów	30	28	32	56	39	48	233
Liczba badanych prób	54	59	92	120	89	120	534
Średnia liczba drobnoustrojów w 1 cm ³ nasienia	5540	5683	42 598	7225	57 530	3030	20 267
% próbek nasienia zawierającego > 150 tys. drobnoustrojów w 1 cm ³	0,0	0,0	7,6	0,8	12,4	0,8	3,6
% próbek nasienia bez wzrostu drobnoustrojów	77,7	33,9	32,6	75,0	42,7	32,5	48,5

Tab. 2. Częstość izolowania poszczególnych drobnoustrojów z mrożonego nasienia buhajów

Drobnoustroje	Stacje unasienniania						Ogółem
	A	B	C	D	E	F	
	izolacja drobnoustrojów w %						
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	5,6	3,4	9,8	7,5	16,9	—	7,1
<i>Corynebacterium sp.</i>	24,1	10,2	29,3	22,5	44,9	5,0	22,3
<i>Escherichia coli</i>	—	—	26,1	—	2,2	0,8	5,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	1,7	6,5	3,3	1,1	7,5	3,9
<i>Pseudomonas sp.</i>	—	—	1,1	0,8	1,1	0,8	0,7
<i>Streptococcus faecalis</i>	—	3,4	—	0,8	1,1	—	0,7
<i>Proteus sp.</i>	—	1,7	—	2,5	—	—	0,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	—	—	—	—	2,2	—	0,4
<i>Micrococcus sp.</i>	—	1,7	—	—	1,1	—	0,4
<i>Citrobacter sp.</i>	—	—	—	—	—	4,2	0,9
<i>Enterobacter sp.</i>	—	—	—	—	—	0,8	0,2
Drożdżaki	1,9	—	1,1	—	1,1	43,3	10,5

lonie identyfikowano zgodnie z ogólnie przyjętą metodą bakteriologiczną.

Wyniki i omówienie

Na podstawie przeprowadzonych badań obliczono, że w 1 cm³ nasienia mrożonego znajdowało się średnio 20 267 drobnoustrojów: 81,3% próbek nasienia zawierało mniej niż 10 000 bakterii/cm³, 13,8% 10 000-100 000/cm³, 4,7% 100 000-500 000/cm³, 0,2% powyżej 500 000/cm³.

Dla porównania warto nadmienić, że badania bakteriologiczne nasienia mrożonego zgromadzonego w Centralnym Banku Nasienia Instytutu Zootechniki w Balicach wykazały, że w 1 cm³ nasienia znajdowało się średnio 80 000 drobnoustrojów (11). Z badań Wierzbowskiego i wsp. wynika, że tylko 29% próbek nasienia zawierało mniej niż 10 000 bakterii/cm³, 39% 10 000-100 000/cm³, 26% 100 000-1 000 000/cm³, 6% powyżej 1 000 000/cm³ (18).

Uzyskane wyniki własnych badań wykazały, że średnia liczba drobnoustrojów w 1 cm³ nasienia buhajów w poszczególnych stacjach unasienniania była różna, najniższa w stacji F wynosiła 3030 bakterii/cm³, najwyższa w stacji E — 57 530/cm³ (tab. 1).

Różnice między stacjami wystąpiły również w odsetkach próbek nasienia, zawierającego powyżej 150 000 bakterii/cm³. W stacjach A i B wszystkie próbki nasienia zawierały takie ilości drobnoustrojów, które odpowiadały wymogom normy (16), natomiast w stacji E odsetek prób nie odpowiadających normom był najwyższy i wyniósł 12,4% (tab. 1). Także odsetek prób, w których notowano całkowity brak wzrostu flory bakteryjnej był różny w poszczególnych stacjach i wahał się od 32,5% w stacji F do 77,7% w stacji A (tab. 1).

Porównując wyniki własnych badań i innych autorów z tego zakresu sprzed kilku lat można zauważyć tendencje do zmniejszania się śred-

niej liczby drobnoustrojów w nasieniu mrożonym buhajów w stacjach unasienniania.

Oprócz badań ilościowych przeprowadzone zostały także badania jakościowe, określające rodzaje drobnoustrojów występujących w nasieniu. Wyniki badań z tego zakresu przedstawiono w tab. 2. Rozpatrując występowanie szczepów bakterii uznawanych za warunkowo-chorobotwórcze należy stwierdzić, że najczęściej izolowanym drobnoustrojem był *Corynebacterium pyogenes* — 7,1% wszystkich prób nasienia, następnie *Escherichia coli* — 5,1% oraz *Pseudomonas aeruginosa* — 3,9%.

W poszczególnych stacjach unasienniania częstość izolowania różnych drobnoustrojów z nasienia buhajów przedstawia tab. 2. W stacjach A, B, D i E najczęściej izolowanym drobnoustrojem z nasienia buhajów był *Corynebacterium pyogenes* (3,4—16,9%), w stacji C *Escherichia coli* — 21,1%, a w stacji F aż w 43,3% wyizolowano drożdżaki.

Analizując częstość występowania bakterii warunkowo-chorobotwórczych w badaniach własnych, nasuwa się wniosek o dość częstym izolowaniu *Corynebacterium pyogenes*, bo aż w 7,1% wszystkich badanych prób nasienia. W różnych stacjach izolowano ten drobnoustrój od 0%—16,9% prób. Jak podaje Wierzbowski, w nasieniu mrożonym tylko w 0,2—2,0% badanych próbek nasienia stwierdzono obecność tego drobnoustroju, a w nasieniu pochodzącym z importu *Corynebacterium pyogenes* był stwierdzony w 1,5% prób (17). Z obserwacji Sawickiej-Wrzosek i Gosiewskiej wynika, że drobnoustrój ten izolowano tylko sporadycznie. We wszystkich z badanych stacji stwierdzono jego obecność tylko 4-krotnie (15).

Escherichia coli izolowana była w 5,1% badanych prób. Wobec faktu stwierdzenia przez Wierzbowskiego w nasieniu mrożonym średnio w 21% badanych prób nasienia *Escherichia coli* (17) odsetek ten nie jest wysoki. Należy podkreślić, że tylko w jednej stacji — C, częściej niż w innych izolowano *Escherichia coli*, bo w 26,1%, natomiast w pozostałych stacjach częstość izolacji tego drobnoustroju była niska i wahała się w granicach 0%—2,2%.

Pseudomonas aeruginosa, który budzi zwykle największe zainteresowania, ponieważ stosunkowo często izolowany bywa z worka napletkowego buhajów (2, 6, 7, 9, 10), stwierdzono w 3,9% wszystkich badanych próbek nasienia, a w poszczególnych stacjach od 0%—7,5%. Z badań Wierzbowskiego wynika, że *Pseudomonas aeruginosa* był spotykany w nasieniu mrożonym w zależności od okresu od 9,4%—11,7% badanych próbek, a w nasieniu pochodzącym z importu został wyosobniony z 3,2% prób (17). Sawicka-Wrzosek i Gosiewska, badając nasienie mrożone buhajów wyizolowały *Pseudomonas aeruginosa* od 0%—35,3% badanych prób nasienia w różnych stacjach unasienniania w

1980 r. i od 0%—13,2% badanych prób w tych samych stacjach w 1981 r. (15).

Poza *Corynebacterium sp.* izolowanym w 22,3% prób nasienia i drożdżakami wyizolowanymi w 10,5% prób, pozostałe drobnoustroje uważane za zanieczyszczenie bakteryjne były stwierdzane w niewielkiej liczbie badanych próbek nasienia. Roslanowski i wsp. dowodzą, że średnią liczbę drobnoustrojów w 1 cm³ nasienia można uważać za jeden z wykładników stanu higienicznego zakładu (14), dlatego też należy dążyć do polepszenia warunków sanitarno-higienicznych, gdyż stała poprawa w tym zakresie może wyraźnie przyczynić się do zmniejszenia lub wyeliminowania zanieczyszczeń bakteryjnych w nasieniu.

Mimo, iż brakuje dostatecznych dowodów na bezpośrednią zależność między obecnością w nasieniu drobnoustrojów warunkowo-chorobotwórczych a jego płodnością, istnieje jednak ryzyko posługiwania się nasieniem zawierającym drobnoustroje, dlatego też konieczna jest stała kontrola zanieczyszczeń bakteryjnych w nasieniu oraz dążenie do używania nasienia zawierającego jak najmniejszą ilość lub zupełnie pozbawionego bakterii.

W świetle przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników wydaje się, że obowiązująca w naszym kraju norma w odniesieniu do liczby drobnoustrojów warunkowo-chorobotwórczych w nasieniu mrożonym (150 000/cm³) jest zbyt tolerancyjna. Można sądzić, iż norma 10 000 bakterii w 1 cm³ nasienia mrożonego byłaby zaleceniem rozsądnym, zmuszającym stacje unasienniania do większej dbałości o warunki sanitarno-higieniczne.

Piśmiennictwo

1. Debruyne R.: Vlaams diergeneesk. Tijdschr. 30, 221, 1961.
2. Flis J., Flis I.: Medycyna Wet. 28, 427, 1972.
3. Instrukcja nr 49 Min. Rolnictwa-Dep. Wet. z dnia 9 grudnia 1978 r. Wet. Sp. II-640/11/78 dot. mikrobiologicznego badania nasienia buhajów.
4. Int. Organization for Standardization (ISO). Frozen semen of breeding bulls. The fifth-ISO proposal, 1976.
5. Kondrašov B.: Moloc. mjas. skotovod. 11, 32, 1975.
6. Króliński J.: Medycyna Wet. 33, 164, 1977.
7. Króliński J.: Medycyna Wet. 33, 298, 1977.
8. Króliński J.: Medycyna Wet. 34, 47, 1978.
9. Marinov P., Batchov M., Zagorski D.: Vet. Sci. Sofia 3, 177, 1966.
10. Nowakowski W., Furwicz A., Heczko P.: Medycyna Wet. 36, 117, 1980.
11. Nowakowski W., Wierzbowski S.: Medycyna Wet. 34, 488, 1978.
12. Ostaszko F. J.: Proc. 8th Int. Congress Anim. Reprod. 5, 1235, 1976.
13. Plasecka-Serafin M.: Medycyna Wet. 25, 497, 1969.
14. Roslanowski K., Łosiński T., Michałkiewicz M.: Medycyna Wet. 33, 33, 1977.
15. Sawicka-Wrzosek K., Gosiewska A.: Medycyna Wet. 33, 602, 1982.
16. Tymczasowe wytyczne Min. Rolnictwa Dep. Wet. w sprawie oceny warunków sanitarno-higienicznych w stacjach hodowli i unasienniania zwierząt. Wet. Sp. 640/1/79 z dnia 1.02.1979.
17. Wierzbowski S.: Medycyna Wet. 33, 66, 1982.
18. Wierzbowski S., Kruczek G., Gądkiewicz A., Wierzbowski E.: Proc. Danish Conf. Actual. Biol Hyg. Problems of A.I. in Cattle, Pawłowice 1973, s. 60.

Adres autora: mgr Ewa Bukowicz, Os. Czwartaków 10 m. 34, 62-020 Swarzędz

Буквич Э. — Появление условноболезнетворных микроорганизмов в замораживаемом бычьем семени

Zamrażаемое семя 233 быков из 6 осеменительных станций было подвергнуто бактериологическому исследованию в количественном и качественном отношении. В 1 см³ семени находилось в среднем 20 267 микроорганизмов: 81,3% исследуемых проб содержало меньше 10 000 бактерий/см³, 13,8% 10 000—100 000/см³, 4,7% 100 000—500 000/см³ и 0,2% сверх 500 000/см³. На отдельных осеменительных станциях число микроорганизмов в 1 см³ семени было разное (3030—57 530). Чаще всего изолированными условноболезнетворными бактериями из замораживаемого бычьего семени были: *Corynebacterium pyogenes* — 7,1% всех исследуемых проб, *Escherichia coli* — 5,1% и *Pseudomonas aeruginosa* — 3,9%. Для повышения гигиенических условий на осеменительных станциях кажется целесообразным понижение обязывающей нормы относительно числа микроорганизмов в 1 см³ замораживаемого семени от 150 000 до 10 000.

Bukowicz E. — Prevalence of conditionally pathogenic bacteria in the frozen semen

The semen of 233 bulls derived from six artificial insemination centres was examined bacteriologically. On an average 20 267 bacteria were found in 1 ml of the semen. Less than 10 000 bacteria per 1 ml was noted in 81.3% of samples, from 10 000 to 100 000 in 13.8%, from 100 000 to 500 000 in 4.7%, and over 500 000 in 0.2%. In individual centres the number of bacteria in 1 ml of the semen ranged considerably (3030 to 57 530). Conditionally pathogenic bacteria isolated from the semen of bulls were usually designated as *C. pyogenes* (7.1%), *E. coli* (5.1%) and *Ps. aeruginosa* (3.9%). In order improve hygienic conditions in artificial insemination centres the author suggests to lower the acceptable number of bacteria from 150 000 to 10 000 per 1 ml.

ANDRZEJ RAS, TADEUSZ GLAZER

Wpływ podklinicznej kwasicy na przebieg okresu okołoporodowego i dalszą płodność krów mlecznych^{*)}

Katedra Położnictwa Wydziału Weterynaryjnego ART, 10-957 Olsztyn-Kortowo II

Dobłą płodność krów warunkuje wiele czynników związanych z oddziaływaniem środowiska zewnętrznego i wewnętrznego na organizm zwierzęcia (1, 8, 9, 12, 13, 14, 17, 23, 26). Szczególnie istotny jest wpływ żywienia, utrzymania i pielęgnacji w ostatnich tygodniach ciąży (okres zasuszenia). Obserwowana w tym czasie (nierzadko) gwałtowna zmiana karmy, karmienie kiszonkami złej jakości, zawierającymi duże ilości kwasu octowego i masłowego, często zbutwiałymi prowadzi do niestrawności kwaśnej żwacza (3, 4, 5, 7, 8, 13, 19, 25, 26). Niewłaściwa fermentacja paszy w przedżołądkach przy równoczesnym niedoborze związków azotowych sprzyja powstawaniu nadmiaru kwasów organicznych, a zwłaszcza kwasu mlekowego. Kwas mlekowy przenika do krwi, wywołując przesunięcia w jej zdolnościach buforowania, co prowadzi do zaburzeń w równowadze kwasowo-zasadowej (RKZ) (2, 3, 6, 7, 8, 13, 18, 19, 25).

Raufuszkiewicz i wsp. (19, 20) przeprowadzili badania nad wpływem doświadczalnej kwasicy na motorykę macicy. Autorzy ci obserwowali poważne zaburzenia w dynamice macicy, aż do jej zupełnego bezwładu. Lotthammer (14), Kudlač (12), Raufuszkiewicz i wsp. (20) obserwowali wzrost liczby schorzeń okołoporodowych (zatrzymanie łożyska, ciężkie porody, zalegania poporodowe) oraz obniżenie zdolności reprodukcyjnych u krów z zaburzeniami równowagi kwasowo-zasadowej.

Celem pracy było stwierdzenie intensywności występowania podklinicznych stanów kwasicy w stadach krów mlecznych oraz okre-

ślenie ich wpływu na przebieg okresu okołoporodowego z uwzględnieniem różnych warunków środowiskowych, wydajności, oraz profilaktycznego podawania kwaśnego węgla sodu jako buforu neutralizującego stan subklinicznej kwasicy.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w okresie od listopada 1983 do maja 1985 r. w oborach dwóch różnych gospodarstw państwowych. Materiał badawczy stanowiło 150 krów rasy ncb, wolnych od gruźlicy i brucelozy (po 75 szt. w gospodarstwie A i B). Oba gospodarstwa różniły się między sobą warunkami żywienia i pielęgnacji zwierząt, organizacją obsługi zootechnicznej oraz wydajnością mleczną krów. W gospodarstwie A średnia wydajność mleczna wynosiła 4100 kg mleka, w gospodarstwie B — 2572 kg mleka.

Żywienie zimowe krów w gospodarstwie A oparte było na dawce pokarmowej, obejmującej: kiszonki z traw lub kukurydzy (25-30 kg/sztukę dziennie), buraki poly-past (10 kg/szt.), siano łąkowe (4 kg/szt.), paszę treściwą (B, B₁, CJ, otręby pszenne) oraz okresowo młóto (wysłodziny browarniane) i dodatki mineralne.

W okresie letnim krowy korzystały z pastwiska oraz otrzymywały paszę treściwą w ilości 2-3 kg/szt. i sianę jęczmienną.

Krowy w gospodarstwie B w miesiącach zimowych żywione były kiszonką z kukurydzy i mieszanki traw z liśćmi buraczanymi w ilości 40 kg/sztukę, sporadycznie burakami pastelnymi w ilości 5 kg/szt., sianem w ilości ok. 2 kg/szt. Pod koniec okresu alkierzowego gospodarstwo borykało się z kłopotami paszowymi i wówczas dawki pokarmowe były zmniejszone. Kiszonki w tym okresie były szczególnie złej jakości, niechętnie zjadane przez zwierzęta. W okresie letnim podstawą żywienia było pastwisko oraz siana jęczmienna i niewielkie ilości siana.

Wszystkie krowy na 4-3 tygodnie przed wylicznym terminem porodu poddawano badaniu klinicznemu w celu stwierdzenia ogólnego stanu zdrowia oraz badaniu na ciążę, w celu potwierdzenia jej wysokości i żywotności płodu. Krowy do oznaczeń

^{*)} Praca wykonana w ramach problemu MR II. 10.