

WPŁYW SZYBKOŚCI OZIĘBIANIA I STĘŻENIA GLICEROLU NA JAKOŚĆ MROŻONEGO NASIENIA

LECH JAŚKOWSKI, ST. KORYCKI

Zakład Fizjologii Rozrodu i Laktacji Instytutu Fizjologii i Żywienia PAN oraz
Zakład Inseminacji i Zwalczenia Bezpłodności Instytutu Weterynarii, Bydgoszcz
Kierownik: prof. dr L. Jaśkowski

Motywy podjęcia niniejszych badań były niedawne doniesienia Polge'a (1957) wskazujące na dużą oporność nasienia na szybkie oziębianie w czasie zamrażania oraz fakty znane już dawniej, mianowicie zależności pomiędzy jakością mrożonego nasienia a wzajemnym oddziaływaniem niektórych elementów przygotowywania. Na przykład O'Dell i wsp. stwierdzili, że inna jest optymalna szybkość oziębiania dla nasienia rozrzedzonego CŻ, inna zaś dla nasienia rozrzedzonego mlekiem. Polge (1957) stwierdził, że nasienie krótko ekwilibrowane nie znosi powolnego oziębiania. Miller i Van Demark (1954) stwierdzili, że optymalne stężenie glicerolu zależy od stężenia cytrynianu oraz suchej masy składników organicznych rozrzedzalnika.

W dostępnej literaturze nie znaleźliśmy porównania wpływu różnych szybkości oziębiania we współdziałaniu z różnymi stężeniami glicerolu w rozcieńczalniku na jakość nasienia mrożonego. Temu zagadnieniu poświęcono przeto niniejsze badanie.

Materiał i metodyka. Do doświadczeń użyto 30 ejakulatów od 3 buhajów nizinnych czarno-białych. Nasienie rozrzedzano rozcieńczalnikiem cytrynianowo-żółtkowym, doprowadzając je po wstępnym rozrzedzeniu do stężenia 50 milionów plemników na 1 ml. Po ochłodzeniu do temperatury $+2^{\circ}\text{C}$, rozrzedzone nasienie dzielono na 5 części, które rozrzedzano równą objętością buforu cytrynianowego (2,9%) z taką zawartością glicerolu, aby po ostatecznym rozcieńczeniu nasienia uzyskać próby zawierające: 3,0, 6,0, 7,5, 9,0 i 10,5% glicerolu. Po 12-godzinnej ekwilibracji nasienie rozlewano do ampułek i zatapiano. Ampułki ponumerowane liczbami porządkowymi od 1 do 10 — po 3 ampułki jednego szeregu i jednego stężenia glicerolu zamrażano jedną z wymienionych metod. Pierwsza z nich odpowiadała metodyce stosowanej w terenowych stacjach unasienniania w Anglii (Olbrycht, 1956), a druga opierała się na zasadzie półautomatycznego oziębiania nasienia zastosowanej przez Polge'a i Lovelocka (1952).

Metody 3—10 polegały na przenoszeniu ampulek z nasieniem do kolejnych łaźni oziębiających, przy czym temperatura w poszczególnych łaźniach w zależności od zaplanowanej szybkości oziębiania była następująca:

- 3: 0, —5, —10, —15, —20, —25, —30, —35, —40, —45, —50, —60, —79°C
 4: —15, —20, —25, —30, —35, —40, —45, —50, —60, —79°C
 5: —30, —35, —40, —45, —50, —60, —79°C
 6: 0, —5, —10, —15, —30, —50, —79°C
 7: 0, —10, —30, —79°C
 8: 0, —30, —79°C
 9: 0, —50, —79°C
 10: 0, —60, —79°C.

Jakość nasienia określano na podstawie szacowania odsetka plemników o ruchu postępowym po podgrzaniu go do 38°C, po pobraniu, po ekwilibracji oraz w 1, 3 i 5 dni po zamrożeniu; za drugie kryterium jakości przyjęto czas przeżywania plemników w temperaturze +46,5°C, który oznaczano po ekwilibracji, w 1, 3 i 5 dni po zamrożeniu.

Przeciętną z trzech ostatnich pomiarów przyjęto za średnią jakość każdej próby.

T a b e l a 1

Ruchliwość plemników nasienia mrożonego metodą 1, 2 oraz metodami powolnego i szybkiego oziębiania, poniżej - 30°

Metoda	Stężenie glicerolu				
	3,0%	6,0%	7,5%	9,0%	10,5%
1	12,4	32,7	34,4	32,9	30,8
2	13,7	35,2	36,5	39,5 ^{xx}	36,9 ^{xx}
3-5	12,4	33,5	34,0	35,9	36,0 ^{xx}
6-9	13,8	31,1	31,0	29,1	26,1 ^{xx}
10	11,1	26,1 ^{xx}	25,1 ^{xx}	22,4 ^{xx}	20,0 ^{xx}
Przeżywanie nasienia mrożonego w temp. +46,5°					
1	30,1	49,7	55,9	57,0	54,0
2	26,1	51,4	55,9	59,4	57,0
3-5	24,5	51,2	57,6	57,4	55,1
6-9	31,5	52,6	53,7	52,2	44,5 ^{xx}
10	23,8 ^{xx}	37,1 ^{xx}	42,1 ^{xx}	40,8 ^{xx}	32,8 ^{xx}

Różnica statystycznie znamienne przy P = 0,01.

W y n i k i b a d a n i a. Ze względu na ograniczone rozmiary referatu podano tu tylko najważniejsze dane uzyskane na podstawie naszych doświadczeń. Najlepsze wskaźniki jakości nasienia mrożonego uzyskano dla

poszczególnych stężeń glicerolu przy półautomatycznym oziębianiu nasienia. Najgorszą jakość nasienia stwierdzono w nasieniu zamrażanym metodą 10, w której wstępna szybkość oziębiania przekroczyła $60^{\circ}/\text{min}$.

Wzajemna współzależność stężenia glicerolu i szybkość oziębiania wyraziła się w ten sposób, że przy powolnym oziębianiu w strefie od -30 do -79° uzyskano najlepsze wskaźniki jakości nasienia przy stężeniach glicerolu 7,5 do $10,5\%$. Natomiast przy szybkim oziębianiu nasienie zawierające więcej niż $7,5\%$ glicerolu wykazywało niższe wskaźniki jakości, niż przy stężeniach glicerolu 6 i $7,5\%$.

Najniższą wrażliwość na duże szybkości oziębiania zdaje się wykazywać nasienie przy przechodzeniu od 0 do -10°C ; w tej strefie oziębiania nawet szybkości przekraczające $50^{\circ}/\text{min}$. zdają się nie uszkadzać nasienia. W strefie od -10 do -30°C oraz od -30 do -50°C szybkości oziębiania przekraczające $30^{\circ}/\text{min}$. zdają się wpływać ujemnie na jakość nasienia mrożonego, i to tym szkodliwiej, im więcej glicerolu znajduje się w rozcieńczalniku. Klasycznego przykładu dostarcza tu porównanie metody 8 i 9. W obu zamrożenie przeprowadzano w 2 etapach, zanurzając w pierwszych dwu kąpielach ampułki z nasieniem na 2,5 minuty, i w końcu w łaźni o temperaturze -79°C . W metodzie 8 po kąpieeli nastawionej na 0°C przenoszono je do -30° , a następnie do -79° , w drugiej najpierw do -50° , a następnie do -79°C . W pierwszym przypadku najwyższa szybkość oziębiania (ok. $53^{\circ}/\text{min}$., osiągnięto między -30 a -50°), w drugim między 0 a -10°C ; ruchliwość nasienia w poszczególnych stężeniach glicerolu kształtowała się przy obu metodach następująco:

Stężenie glicerolu:

	6,0	7,5	9,0	10,5
met. 8	30,0	28,0	26,1	23,8
" 9	30,5	33,7	32,9	28,2
kontr.	32,5	34,4	32,9	30,8

Badania te wykazały ponadto, że istnieje indywidualna wrażliwość nasienia buhajów na dodatek glicerolu. Wyraża się ona czasem przeżywania nasienia glicerolizowanego w porównaniu z przeżywaniem nasienia bez dodatku glicerolu. Okazało się mianowicie, że w przypadku gdy nasienie glicerolizowane żyje dłużej lub co najmniej równie długo jak nasienie bez dodatku glicerolu, jakość nasienia mrożonego jest dobra. Jeżeli natomiast nasienie glicerolizowane żyje krócej od nieglicerolizowanego, jakość nasienia mrożonego jest słaba.

O m ó w i e n i e w y n i k ó w. Badania nasze wyjaśniają do pewnego stopnia rozbieżności istniejące w dotychczasowym piśmiennictwie co do optymalnego tempa oziębiania. Na przykład konieczność wolniejszego tempa oziębiania przy stosowaniu rozrzedzalników mlecznych (O' D e l l

i współpr. 1958) zdaje się wynikać nie tylko ze składu i właściwości samego rozcieńczalnika, ile z wysokiego dodatku glicerolu stosowanego przy tych rozcieńczalnikach.

Możliwość stosowania dużych szybkości oziębiania na pewnych etapach mrożenia posiada duże znaczenie praktyczne w sensie skrócenia i uproszczenia techniki zamrażania. Wydaje się, że będzie można uzyskiwać zupełnie dobre wyniki zamrażania za pomocą przenoszenia nasienia do dwóch kolejnych łaźni oziębiających, pod warunkiem zabezpieczenia nasienia przed zbyt szybkim oziębianiem w czasie przechodzenia temperatur od -10 do -50°C . Korzystne tempo zapewnia półautomatyczna metoda oziębiania, zastosowana w naszym doświadczeniu.

PIŚMIENNICTWO

- Polge C. (1957): Low temperature storage of mammalian spermatozoa. Proc. Roy. Soc. B : 147 : 498.
- Polge C., Lovelock J. E. (1952): Preservation of bull semen at -79° . Vet. Rec. : 64 : (27).
- Olbrycht T. (1956): Technika długotrwałego przechowywania nasienia buhajów w suchym lodzie. Med. Wet. 12 : 717.
- O'Dell W. T., Almquist J. O. (1957): Freezing bovine semen. I. Techniques for freezing bovine spermatozoa in milk diluents. J. Dairy Sci. 40 : 1534.
- Miller W. J., Van Demark N. L. (1954): The influence of glycerol, vario aspects of temperature and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at sub-zero temperatures. J. Dairy Sci. 37 : 45.

Л. Яськовски, Ст. Корицки (Быдгощ)

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ОХЛАЖДЕНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛИЦЕРОЛА НА КАЧЕСТВО ЗАМОРОЖЕННОГО СЕМЕНИ

Резюме

Проведено исследования по замораживанию семени быка с применением прибавки 3, 6, 7,5, 9 и 10,5% глицерола, 12 часового срока эквilibрации и 10 различных скоростей охлаждения семени на различных этапах замораживания. При охлаждении от 0° до -10° семя переносило довольно значительные скорости охлаждения без вреда по отношению к качеству после замораживания. Скорость охлаждения между -10° и -30°C , превосходящая $30^{\circ}/\text{мин}$. оказывала отрицательное влияние на качество замороженного семени: скорость охлаждения $40^{\circ}/\text{мин}$. между -30° и -50°C оказывала тоже отрицательное влияние на качество замороженного семени.

Большие скорости охлаждения оказывали особенно неблагоприятное влияние на пробы семени, содержащие высокую концентрацию глицерола. При медленном охлаждении между -10° и -50°C пробы, содержащие 9 и 10,5% глицерола проявляли лучшее качество, чем пробы содержащие более низкую концентрацию глицерола.

L. Jaśkowski, St. Korycki (Bydgoszcz)

THE EFFECT OF COOLING RATE AND OF GLYCEROL CONCENTRATION
UPON QUALITY OF FROZEN SEMEN

Experiments have been conducted on freezing of bull semen with special reference to the cooling velocity and its relation to different glycerol concentrations in semen diluent (3,0 6,0 7,5 9,0 and 10,5% of glycerol being added).

When freezing from 0 to -10°C the semen endured high cooling velocities without any harm to its quality after freezing. Between -10° and -30°C the cooling rate exceeding 30°C per minute influenced negative the quality of frozen semen; when frozen from -30° to -50° the semen was also susceptible to high cooling velocities.

High cooling rates influenced especially harmful the samples of semen containing high glycerol concentration. On the other hand when cooling slowly between -10 and -50°C , samples containing 9 and 10,5% of glycerol proved to have better quality after thawing than those of lower glycerol concentration.