

PRÓBA OKREŚLENIA ZANIECZYSZCZEŃ BAKTERYJNYCH NASIENIA  
METODĄ BREEDA

Jacek Judek, Jędrzej M. Jaśkowski

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Inseminacji  
Instytutu Weterynarii, Oddział w Bydgoszczy

Wierzbowski i wsp. [6] stwierdzili, że na 2850 zbadanych ejakulatów nasienia mrożonego 26% zawierało więcej niż 100 000, a 11% więcej niż 500 000 drobnoustrojów na mililitr. Jakkolwiek brak jest wyraźnych dowodów, aby zawartość drobnoustrojów wyższa niż 100 000/ml wpływała ujemnie na zdolność zapładniająca nasienia - duże ich stężenie w nasieniu uważa się za niepożądane. Tymczasowe wytyczne Departamentu Weterynarii z 1979 r. przewidują, że w nasieniu świeżym nie powinno być więcej niż 500 000 drobnoustrojów na ml, w nasieniu mrożonym - konserwowanym 150 000 i 50 000 w nasieniu przechowywanym w stanie płynnym. Obowiązująca u nas metoda określania liczby drobnoustrojów za pomocą posiewów na agar z krwią [2] jest zarówno czasochłonna i kosztowna, jak i w warunkach laboratorium inseminacyjnego trudna do wykonania, szczególnie w przypadkach, gdy ilościowej kontroli bakteriologicznej miałoby się poddać każdy ejakulat przeznaczony do konserwacji nasienia. Te względy spowodowały, że postanowiono sprawdzić czy wprowadzona w roku 1911 metoda Breeda do oznaczania bakterii w mleku nie

mogłaby znaleźć zastosowania praktycznego. Zasadniczym celem badań było ustalenie czy wymieniona metoda jest w przybliżeniu porównywalna z metodą posiewu.

#### MATERIAŁ I METODY

Analizie poddano 86 ejakulatów pobranych od 10 buhajków w wieku 18-24 miesięcy. Posiew na podłoże bakteryjne wykonywano około 2 godziny po pobraniu, rozcieńczając nasienie przed posiewem wyjałowionym roztworem fizjologicznym soli w stosunku 1:100 i 1:1000. Posiewano 0,1 ml odpowiedniego rozcieńczenia na dwie płytki agaru z krwią. Z liczby wyrosłych kolonii obliczano liczbę bakterii w 1 ml.

Metodę Prescott-Breeda [1] zmodyfikowano w ten sposób, że na powierzchni 1 cm<sup>2</sup> rozpościerano nie 0,01, lecz 0,005 ml nasienia. Po utrwaleniu preparatów 96% alkoholem i zabarwieniu barwnikiem Löfflera, przeglądano przy powiększeniu 1000 razy 20, 40, 80 i 120 pól widzenia, obliczając sumę zauważonych bakterii. Przeliczenia wykonywano stosując współczynnik f, obliczony dla poszczególnej liczby pól wg wzoru:

$$f = \frac{d}{h \cdot r^2 \cdot n},$$

w którym

d - powierzchnia rozmazu (100 mm<sup>2</sup>),

h - grubość warstwy nasienia w mm,

r - promień pola widzenia,

n - liczba przejranych pól widzenia.

Współczynnik ten dla 20, 40, 80 i 120 pól widzenia w mikroskopie, w którym promień pola widzenia przy zastosowanych okularach i obiektywach był równy 0,1 mm, wyniósł w zaokrągleniu: 32,0; 16,0; 8,0 i  $5,3 \cdot 10^3$ . Mnożąc sumę dostrzeżonych drobnoustrojów przez współczynnik  $f$ , uzyskiwano liczbę drobnoustrojów w 1 ml. W celach orientacyjnych przebadano również obiema metodami 9 ejakulatów zamrożonych w słomkach. Wyniki liczbowe opracowano statystycznie.

### WYNIKI BADAŃ

Z tabeli 1 wynika, że w 86 ejakulatach badanych metodą Breeda w zależności od liczby przejranych pól widzenia stwierdzono w 1 ml nasienia od 57 do  $91 \cdot 10^3$  drobnoustrojów. W tabeli 2 przedstawiono rozmieszczenie badanych ejakulatów według stopnia zanieczyszczenia i techniki badania. Bez względu na zastosowaną metodę najwięcej ejakulatów znalazło się w przedziale prób zawierających od 1000 do 200 000 drobnoustrojów, przy czym wraz ze wzrostem stopnia czułości metody zmniejszała się liczba prób zerowych, rosła zaś liczba prób zawierających niepoliczalną ilość drobnoustrojów. Stopień korelacji między liczbą drobnoustrojów obliczonych metodą Breeda i metodą posiewu był na ogół niezbyt wysoki (tab. 3). Najwyższy współczynnik korelacji  $r = 0,49$  wystąpił między liczbą drobnoustrojów obliczonych w 40 polach widzenia a liczbą stwierdzoną metodą posiewu przy rozcieńczeniu 1:100. Najniższy przy zsumowaniu ich w 20 polach widzenia i posiewie przy rozcieńczeniu 1:100. Bardzo niska korelacja rzędu  $r = 0,191$  wystąpiła również między liczb-

Tabela 1

Przeciętna liczba drobnoustrojów w 1 ml nasienia  
stwierdzona porównywanymi metodami

Metoda	Liczba prób stopień rozrzedzenia	Liczba prób	Liczba drobnoustrojów w 1 ml $n \cdot 10^3 \pm E$
Breeda	20	86	$71 \pm 18,5$
	40	86	$91 \pm 25,8$
	80	82	$67 \pm 13,4$
	120	73	$57 \pm 5,5$
Posiew	1 : 100	77	$111 \pm 18,0$
	1 : 1000	81	$342 \pm 95,0$

Rozmieszczenie prób zawierających policzalną zawartość drobnoustrojów  
różnymi metodami

Liczba drobnoustrojów w 1 ml n · 10 <sup>5</sup>	Metoda Breeda przy przejrzeniu pół widzenia			Metoda posiewu przy rozcieńczeniu		
	20	40	80	120	1:100	1:1000
0	37	21	8	5	0	7
0-2,0	42	56	69	65	65	58
2,1-4,0	4	6	5	1	8	5
4,1-6,0	-	-	-	2	2	4
6,0	3	3	-	-	2	7
Niepoliczalne	-	-	4	13	9	5
Razem	86	86	82 (86)	73 (86)	77 (86)	81 (86)

Tabela 3

Współczynnik korelacji  
między wybranymi metodami obliczania drobnoustrojów

Porównywane metody	Wielkość współczynnika korelacji
Breed - 40/posiew 1:100	0,490
Breed - 120/posiew 1:1000	0,380
Breed - 20/posiew 1:100	0,170
Breed - 40/Breed 80	0,914
Breed - 20/Breed 40	0,928
Posiew 1:1000/posiew 1:1000	0,191

bą drobnoustrojów określoną metodami posiewu przy porównywalnych rozcieńczeniach. Należy nadmienić, że w obliczeniach na podstawie posiewu 2 płytek dla każdego rozcieńczenia występowały niejednokrotnie bardzo duże różnice, wskazujące na to, że w poszczególnych porcjach posiewu zawiesiny znajdowały się niejednakowe ilości drobnoustrojów. Zaznaczyło się to szczególnie przy porównywaniu prób rozcieńczonych w stosunku 1:100 i 1:1000. Mniejsza liczba drobnoustrojów w posiewie rozrzedzonym 100 razy była spowodowana niepoliczalnością drobnoustrojów przy mniejszym rozcieńczeniu, podczas gdy przy rozcieńczeniu większym można było bez trudu policzyć 200 i więcej kolonii - co oznaczało zawartość ponad dwu milionów drobnoustrojów w 1 ml.

W nasieniu mrożonym stwierdzono średnio  $45,0$  i  $145 \cdot 10^3$  drobnoustrojów w posiewach po rozrzedzeniu prób 1:100 i 1:1000 oraz  $31, 40, 39$  i  $42 \cdot 10^3$  przy zsumowaniu drobnoustrojów w 20, 40, 80 i 120 polach widzenia.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Liczba drobnoustrojów określona w niniejszych badaniach metodą Breeda i metodą posiewu przy rozcieńczeniu 1:100 zbliżona jest do wartości stwierdzanych w poprzednich badaniach [3]. Mimo że metoda Breeda była już stosowana do oznaczania liczby drobnoustrojów w nasieniu [4], ustępuje z całą pewnością metodzie posiewów, która przewyższa pierwszą przede wszystkim możliwością określenia zawartości drobnoustrojów żywych, a następnie jest bardziej dokładna, jeżeli chodzi o określenie bardzo małych i bardzo dużych ilości drobnoustrojów w nasieniu. Poz-

wala wreszcie drobnoustroje identyfikować. Metoda posiewów ma jednak również ujemne strony, jest stosunkowo droga i nie daje informacji o stopniu zanieczyszczenia nasienia w ciągu kilkunastu minut po jego pobraniu.

Biorąc pod uwagę, że metodą Breeda nie można odróżnić drobnoustrojów żywych od martwych należałoby się spodziewać, że liczba drobnoustrojów w zbadanych przez nas ejakulatach określona tą metodą powinna być wyższa niż metodą posiewu. Fakt, że było na odwrót potwierdza opinię, że metoda nie jest precyzyjna.

Z drugiej strony niska korelacja między wyliczeniami uzyskanymi na podstawie posiewów przy rozrzedzeniu nasienia 1:100 i 1:1000 wskazuje również na względną dokładność metody posiewu. Dokładność tę można by zwiększyć sporządzając z każdego rozcieńczenia co najmniej 5 posiewów i przyjmując średnią z trzech (przy odrzuceniu wartości skrajnych) za praktyczną liczbę drobnoustrojów w 1 ml nasienia. Zwiększyłyby to znacznie koszty badania zarówno materiałowe, jak i w zakresie nakładu pracy.

Metoda Breeda mimo braku precyzji w warunkach laboratorium inseminacyjnego mogłaby dać duże usługi. Jeżeli założymy, że miałaby ona dać jedynie odpowiedź czy nasienie z punktu widzenia wytycznych Departamentu Weterynarii spełnia warunki higieniczne, wystarczyłoby zbadać czy w określonej liczbie pól widzenia suma drobnoustrojów nie przekracza normy. Taką normą np. w naszym przypadku dla nasienia świeżego i w 40 polach widzenia jest 30 drobnoustrojów. Jeżeli jest ich więcej - istnieje duże prawdopodobieństwo, że 1 ml nasienia zawiera więcej niż  $500 \cdot 10^3$  bakterii. Jeżeli 30 drobnoustrojów znajdzie się



w mniejszej niż 40 liczbie pól widzenia, można zrezygnować z przeglądania dalszych pól.

Analogicznie norma dla nasienia mrożonego to 9 drobnoustrojów, a dla konserwowanego w stanie płynnym 3 drobnoustroje w 40 polach widzenia. Oznaczenia te jednak są jeszcze mniej precyzyjne.

Oczywiście sposób określania zawartości drobnoustrojów metodą Breeda zależy od wielkości współczynnika  $f$ , który trzeba wyliczyć dla każdego mikroskopu - w zależności od średnicy pola widzenia.

Reasumując należy stwierdzić, że metoda Breeda nie może być traktowana jako podstawa do określenia stopnia zanieczyszczeń bakteryjnych nasienia, pozwala jednak w warunkach laboratorium inseminacyjnego zorientować się czy nasienie świeże odpowiada warunkom wytycznych Departamentu Weterynarii.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Grajewski H.: Badania porównawcze nad wartością diagnostyczną kilku płynów stosowanych w pośredniej analizie cytologicznej mleka przy rozpoznawaniu mastitis u krów. Praca doktorska, Wrocław 1965.
2. Hoppe R., Jaśkowski L.: Instrukcja w sprawie sposobu badania i oceny przydatności rozplodowej buhajów z dnia 24 XII 1969. Wet. I. 11/8/68.
3. Jaśkowski L., Różankiewicz E., Szulc L., Kozłowska L.: Zastosowanie sterinoli do odkażania jamy napletkowej u buhajów. Now. Wet. 2, 107, 1972.
4. Kazda J., Lerchova E.: Methode zur bestimmung der Bakterienmenge in der Samenflussigkeit von Bullen. Konf. Fizj. i Pat. Rozrodu RWPG Karlove Vary 1963.

5. Ministerstwo Rolnictwa, Departament Weterynarii: Tymczasowe wytyczne w sprawie oceny warunków sanitarno-higienicznych w stacjach hodowli i unasienniania zwierząt. Wet. Sp II, 640, 1/79.
6. Wierzbowski S., Szmyd D.: Zanieczyszczenie bakteryjne nasienia mrożonego. Medycyna Wet. 32, 339, 1976.

J. Judek, J. M. Jaśkowski

AN ATTEMPT OF ESTIMATING THE BACTERIAL CONTAMINATION  
OF BULL SEMEN BY THE METHOD OF BREED

S u m m a r y

The authors compared in 86 bull ejaculates of fresh semen and 9 of frozen one the number of bacteria per ml. defined by the method of inoculating blood agar medium with semen samples diluted 1:100 and 1:1000 and by counting bacteria in stained semen preparations by Prescott-Breed method. Bacteria were counted in 20, 40, 80 and 120 fields and multiplied by a calculated coefficient  $f$ .

In the same ejaculates the count of bacteria on bacterial medium inoculated with semen diluted 1:100 and 1:1000 gave  $111 \pm 18$ , and  $342 \pm 95 \cdot 10^3$  of bacteria/ml. Summing up bacteria in 20, 40, 80 and 120 fields of vision (with a diameter of 0.2 mm) resulted in 71, 91, 67 and  $57 \cdot 10^3$ /ml bacteria count. The highest correlation coefficient of  $r = 0.49$  existed between the number of bacteria found in 40 fields of vision, and that found in the medium inoculated with semen diluted 1:100. The

bacteria count of frozen semen was lower, however in direct proportion to that found in fresh semen.

Although the method of Breed is inaccurate it may find practical application in A. I. laboratories due to its simplicity for rough estimation of high degree contamination (over  $200 \cdot 10^3/\text{ml}$ ) of bull semen.

Я Юдек, Е.М.Яськовски

Попытка определения бактериального загрязнения семени методом Бреда

#### Резюме

Авторы сравнивали в 86 свежих и 9 замороженных эякулятах число бактерий определенных по методу высеивания на бактериальные среды семени разбавленного 1:100 и 1:1000, с числом определенным в препаратах окрашенных методом Прескотт-Бреда. Бактерии подсчитывали в 20, 40, 80 и 120 полях зрения, а затем умножали на расчетный коэффициент  $\phi$ .

В тех же самых эякулятах установлено по методу высеивания при разбавлении 1:100 и 1:1000 соответственно:  $111 \pm 18$  и  $342 \pm 95 \cdot 10^3$  микроорганизмов в 1 мл. Суммируя бактерии в 20, 40, 80 и 120 полях зрения (диаметром 0,2 мм) установлено в тех же самых эякулятах соответственно: 71, 91, 67 и  $57 \cdot 10^3$  бактерий на мл. Наивысший коэффициент корреляции выступал между числом бактерий подсчитанных методом Бреда в 40 полях зрения и числом бактерий определенных методом высеивания при разбавлении семени 1:100 ( $r = \pm 0,49$ ). Числа бактерий установленных в замороженном семени были ниже, однако они удерживались пропорционально к установленным в неразбавленном семени.

Хотя метод Бреда не является точным, однако имея в виду его простоту, он может найти практическое применение в лабораториях искусственного осеменения для приблизительной оценки бактериального загрязнения (выше  $200 \cdot 10^3/\text{мл}$ ) семени быка.