

TAZE, SULANDIRILMIŞ VE DONDURULMUŞ BOĞA SPERMASININ ÇEŞİTLİ MİKROORGANİZMALAR VE MİKOPLAZMA YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

H. Özge GÜNEY (*) Jale TÜRKAŞLAN (**) Fijen GÜNEY (***)

G İ R İ Ő

Birçok ülkede hayvan ıslahı amacıyla kullanılan sun'i tohumlama teknolojisi aynı zamanda çeşitli bulaşıcı hastalıkların geniş hayvan popülasyonuna yayılmasında önemli bir faktör olabilmektedir.

Sığır sun'i tohumlamasının yaygın olarak uygulanmasıyla değerli damızlık hayvanlara ait dondurulmuş spermaların yüzbinlerce ineğin tohumlanmasında kullanılması, spermaların hastalıklar yönünden kontrolünü gündeme getirmiştir. Bu teknolojinin getirdiği büyük avantajlardan faydalanabilmek için, kullanılan spermaların çeşitli hastalıklar yönünden periyodik kontrollerinin yapılması gerektiği bildirilmektedir (15,24).

Taze spermada bulunan birçok hastalık etkeni, spermanın dondurulma işlemi sırasında yaşamlarını spermatozoit gibi uzun süre düşük metabolik aktivite ile devam ettirebilmektedir. Son yıllarda ülkelerarasında yapılan dondurulmuş sperma alışverişinde görülen artış, bu konunun önemini arttırmıştır. Bu amaçla çeşitli Veteriner Sağlık Örgütleri, spermanın içerdiği normal mikroflorayı ve spermada olmaması gereken patojen mikroorganizmaları açıklayan raporlar yayınlamışlardır (24).

Boğa spermasında Gram (+) ve (-) mikropların sıklıkla ürettiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (17,25). Boğa spermasının normal mikroflorasının genellikle prepusyum ile feces'ten köken aldığı ve *Corynebacterium* spp., *Proteus* spp., *Micrococcus* spp., *Pseudomonas*, *E.coli*'den oluştuğu araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir (1,15,19,20).

Bu konuda çalışma yapan Saika ve ark. (23), 34 adet boğa sperması numunesinden 30 adetinde bir ya da birden çok bakterinin ürettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar izole edilen mikroorganizmaların *Staf.aureus*, *Stre.epidermis*, *Strep.spp.*, *E.coli*, *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aureginosa* ve *Bacillus* spp.'lerden oluştuğunu ifade etmişlerdir.

(*) Araş. Gör. , Dr. Ata. Ü. Veteriner Fakültesi, KARS.

(**) Vet. Hek., T.O.K.İ. Bklğ. Pendik Hay. Hast. Ar. Ens. İST.

(***) Vet. Hek., Ta. Or. ve Köyişleri Bk. İI. Kont. Lab. Md. İST.

Aleem ve ark. (1), benzer bir araştırmada 60 adet boğanın spermasını kullanmışlardır. Araştırmacılar bu spermaların % 27'sinin E.coli, Pseudomonas spp., Staf.aureus, Proteus mirabilis, Strep.pyogenes'le enfekte olduklarını bildirmişlerdir.

Gangadhar ve ark. (8). ise, payetler içinde dondurulmuş 221 adet sperma numunesini kullanarak yaptıkları çalışmada, bazı sperma örneklerinde Colifom bakteri, Pseudomonas, Mikrokok ve Gram (+) mikropların ürediğini bildirmişlerdir.

Boğa spermasında çeşitli mantarların varlığını gösteren yayınlar mevcuttur (8,16,25). Gangadhar ve ark. (8); taze ve dondurulmuş boğa spermasında Aspergillus spp. tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Sun'i tohumlama amacıyla kullanılan boğa spermalarının mikoplazma ile sıklıkla enfekte olduğu ve bu enfeksiyonun asıl kaynağının genellikle prepusyum orijinli olduğu bildirilmektedir (19).

Mikoplazmalar, boğaların genital sistemlerinde 1950'li yıllarda izole edilmiştir (14). Ancak, mikoplazmaların reproduksiyon sistemde ne tür rahatsızlıklara neden olduğu uzun seneler boyunca anlaşılamamıştır (9). Mikoplazma spp'lerinin sığırlarda ekonomik kayıba yol açan bazı hastalıkların kaynağı olduğu bilinmektedir. Bu hastalıklar arasında en önemileri; mastitis, bronkopneumonia, arthritisi, vulvovaginitisi ve infertilite sayılabilir (12, 21,26).

Mikoplazmalar genital kanallarında enfeksiyöz yangı olan boğalardan izole edilebilmesine karşın, klinik olarak sağlıklı hayvanlardan da izole edilmiştir. Mikoplazma ile enfekte hayvanların spermatozoitlerinde anormaliteler, spermatozoit sayısında azalma ve motilite kaybı gibi bozukluklar saptanmıştır (4,24).

Mikoplazma türlerinin çeşitli hastalıklara neden olması yüzünden, uluslararası yapılan sperma alışverişlerinde, söz konusu genetik materyalin mikoplazma ihtiva etmediğine dair bir sertifika, ilgili ülkeler tarafından talep edilmektedir (24).

Spermada mikoplazma aranmasında değişik besiyerleri kullanılmaktadır (7,22,27). Yurdumuzda ise mikoplazma için, Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Pendik Bakteriyoloji Laboratuvarında selektif sıvı ve katı besiyeri rutin olarak uygulanmaktadır (5).

Mikoplazma için kullanılan besiyerleri genellikle sığır kalbi infüzyonu içerir, bu infüzyonun bileşiminde sığır kalbi kıyması, pepton, NaCl ve maya ekstratı bulunmaktadır (5,11,13,18,29). Bu maddelere ilaveten at serumu, taylum asetat, penisilin ilave edilmekte ve katı besiyeri için agar katılmaktadır (5,11,27).

Fish ve ark. (7), Hayflick broth ve agar besiyerini mikoplazma için tavsiye etmişlerdir. Truscott, Ruhnke (27) ve Saed, Aubaidi (27) ise, yukarıda sayılan maddelere ek olarak DNA ve glükoz'u tavsiye etmişlerdir. Aynı araştırmacılar sığır kalbi infüzyonu yerine bacto PPLO brothun kullanılmasının, mikoplazmanın üremesinde daha iyi sonuç verdiğini ifade etmişlerdir.

Mikoplazma türlerinin sun'i tohumlama amacıyla kullanılan boğaların spermalarındaki varlığı konusunda çalışan Fish ve ark. (7), tohumlamada kullanılan 45 adet boğa spermasının 13'ünde mikoplazma tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışma yapan Ungureanu ve ark. (28) toplam 480 adet boğa sperması numunesinden 28 adedinin mikoplazma ile enfekte olduklarını bildirmişlerdir. Feses (6), araştırdığı 120 adet boğadan 33'ünün spermasında sürekli olarak mikoplazma türleri izole ettiğini ifade etmiştir. Truscott ve Ruhnke (27) adlı araştırmacılar da 78 adet sperma numunesinden 26'sında mikoplazma ürediğini bildirmişlerdir.

Gangadhar ve ark. (8)'nin yaptıkları çalışmada ise 46 adet boğa spermasının mikoplazma yönünden incelemesi yapılmış ve sperma numunelerinin hiçbirinde mikoplazma ürememiştir.

Spermaya sulandırılma sırasında katılan antibiyotiklerin, çoğunlukla geniş spektrumlu olduğu, Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizmaların büyük bir kısmına etki ettiği bildirilmiştir (19,29). Spermadaki bakteriyel kontaminasyonu kontrol etmek amacıyla kullanılan antibiyotiklerin önemli bir bölümünün mikoplazmalara etkili olmadığı ifade edilmiştir (11).

MATERYAL VE METOT

Araştırmada Tarım, Orman ve Köyişleri Bakanlığı, İstanbul İl Müdürlüğü'ne bağlı Şenlikköy Sun'i Tohumlama İstasyonunda barındırılan boğaların on dört adetinin sperması, çeşitli mikroorganizmaların ve mikoplazmaların aranması amacıyla kullanıldı.

Çalışma 3 aşamada yürütüldü;

1. Aşamada; 6 adet boğadan 1'er ejakulat, taze ve payetler içinde dondurulmuş spermanın mikrobiyolojik muayenesi yapılmak üzere kullanıldı.

Steril şişelere alınan spermalar aşağıda bileşimi verilen "Kanlı Agar ve McConkey" besiyerlerine ekilerek, Gram (+) ve Gram (-) mikropların üretilmesinde kullanıldı.

Kanlı Agar :

Beef extrat	10 gr.
Pepton	10 gr.
NaCl	5 gr.
Agar	15 gr

Bu maddeler eritilerek 1 litre distile suya ilave edildi. Karışım 15 dakika süre ile 121 derecede sterilize edildi ve 50 dereceye kadar soğutuldu. Üzerine % 5-10 oranında (yaklaşık 7 cc) koyun kanı ilave edilerek ve rotasyon hareketi ile karıştırıldı. Steril petri kutularına yine steril pipetlerle 15'er cc miktarında döküldü ve +4 derecedeki buzdolabında saklandı (2).

McConkey Agar :

Stok McConkey Buyyon (çift güçlü)	500 cc.
Laktose	10 gr.
Agar	11 gr.
Distile su	500 cc.

Karışımın pH'ı 7,5'a ayarlandı. 115 derecede 15 dakika süre ile sterilize edildi (3).

Gram (+) ve (-) mikroorganizmaların kontaminasyonunun tespiti için yukarıdaki besiyerlerine ekimleri yapılan sperma numuneleri, 37 derecede 24 saat inkubasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kontrol edilen petrilere, üreyen kolonilerden aşağıdaki şekilde gram boyama yapılarak identifikasyon gerçekleştirildi.

Petride tek düşmüş koloni, temiz bir lam üzerindeki bir miktar distile suya öze ile alınarak homojen bir şekilde karıştırıldı. Preparat havada kurutuldu, 3 kez alevden geçirilerek tespit edildi ve kristal viyole ile 2-3 dakika süre ile boyandı. Bu süre sonunda boya döküldü. Su ile yıkama yapılarak, preparat üzerine lugol ilave edildi ve bir dakika sonra lugol akıtıldı, ardından su ile yıkandı. Preparat alkolde dekolore edildi, su ile yıkandı ve sulandırılmış karbol fuksin ile 30 saniye boyandı. Bu boya su ile yıkandı ve kurutma kağıdı kullanılarak kurutuldu. Sedir yağı damlatılarak immersiyon objektifi ile preparat muayene edildi. Mor boyanan mikroorganizmalar Gram (+), pembe boyananlar Gram (-) olarak değerlendirildi (10).

Sperma numunelerinde mikoplazmaların aranması için, aşağıda bileşimi verilen selektif sıvı ve katı besiyerlerine ekimler yapıldı.

Selektif Sıvı Besiyeri :

Sığır kalbi infüzyonu	80 ml.
60-65 dereceye getirildikten sonra pH'ı 7,8'e ayarlandı.	
Steril at serumu	20 ml.
Thallium asetat	1 ml. (1/80 stok dilüsyonundan).
Kristal Penisilin	500 U/1 ml.

Kapaklı steril tüplere 9'ar ml hacminde konulduktan sonra +4 derecedeki buzdolabında muhafaza edildi (5).

Selektif Katı Besiyeri :

Sığır kalbi infüzyonu 80 ml.

Agar bakteriyolojik 1 gr.

120 derecede 15 dakika süre ile sterilize edildi, ardından 60-65 dereceye soğutuldu.

Steril at serumu 20 ml.

Thallium asetat 1 ml. (1/10 stok dilusyonundan).

Kristal penisilin 500 U/1 ml. besi yeri için

pH 7,8'e ayarlandı.

Steril pipet ile 15-20 ml miktarlarında steril petri kutularına taksim edildi. +4 derecedeki buzdolabında petri kutuları ters çevrilerek muhafaza edildi (5).

Numuneler Mikoplazma yönünden muayene için, yukarıda belirtilen selektif besiyerlerine ekilerek 37 derecede 3 gün süre ile inkubasyona bırakıldı. 3. günün sonunda mikroskopik muayene yapılarak, üreme olmayan örneklerin pasajı yapıldı. Pasaj sonunda üreme görülmeyenler, negatif olarak değerlendirildi.

2. Aşamada : Değişik 6 adet boğaya ait spermanın Fransa'dan 50 gramlık poşetler içinde ithal edilen sperma sulandırıcısı (Laciphos 478-IMV, France) ile sulandırıldıktan sonra, mikrobiyolojik ekimleri yapıldı (Gliserollü sulandırıcı katılmadan önce). Ayrıca, bu aşamada Gram (+) ve (-) mikroorganizmalar yönünden sulandırma sıvısının da muayenesi yapıldı.

3. Aşamada : 2 adet boğadan alınan spermanın sulandırılmış ve dondurulmuş numunelerinin yapılan ekim sonuçları karşılaştırılarak, ayrıca sulandırıcı olarak kullanılan Laciphos adlı sulandırıcının (Toz halinde) mikrobiyolojik muayenesi yapıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

1. Aşamada kullanılan 6 adet boğaya ait taze spermada yapılan ekimler sonucunda, toplam 5 adet boğanın spermasının çeşitli mikroorganizmaları içerdiği tespit edildi. 1 adet boğada ise hiçbir üreme saptanmadı. Üreme tespit edilen 5 adet boğadan üç adedinin spermasında proteus spp. ve Aspergillus Fumigatus, birinin spermasında proteus spp., birinin spermasında yalnız Aspergillus Fumigatus görülmüştür.

Payetler içinde dondurulmuş spermanın eritildikten sonra yapılan ekimleri sonucunda, herhangi bir üremeye rastlanılmamıştır.

2. Aşamada ise; yine 6 adet boğaya ait spermanın sulandırma işlemi aşamasında (Gliserol ihtiva etmeyen 1. sulandırmanın hemen ardından) alınan numunelerin ve sadece sulandırma sıvısının yapılan ekimlerinde şu mikroorganizmalar üretilmiştir.

1 - Sulandırılmış spermada (1. sulandırmanın hemen ardından): 4 adet boğada E.coli, 1 adet boğada E.frondi, 1 boğada E.coli ve Aspergillus fumigatus.

2 - Sulandırma sıvısında (Gliserol ve sperma ihtiva etmeyen): E.coli, diplokok, streptokok, maya.

Sulandırma sıvısında bu denli mikroorganizma üremesi sonucu, kontaminasyonun kaynağını araştırmak amacı ile toz halinde 50 gramlık poşetler içinde Fransa'dan (Laciphos 478-IMV) ithal edilen sulandırıcının ekimi 3. aşamaya dahil edilerek yapılmıştır.

3. Aşamada, 2 adet boğanın sulandırılmış sperması (1. sulandırmanın bitiminde) ile payet içinde dondurulmuş spermasının yapılan ekimi sonucunda, hiçbir üreme tespit edilememiştir. İlave olarak yapılan Laciphos'un ekiminde de hiçbir mikroorganizma ürememiştir.

3. Aşama halinde yürütülen bu çalışmada yapılan ekimler sonucunda hiçbir mikoplazma etkeni bulunamamıştır.

Araştırmamızın 1. aşamasında kullanılan 6 adet boğanın taze spermasında yapılan ekimler sonucu 5 adet boğada tespit edilen Proteus spp., Aspergillus spp., diğer araştırmacıların sonuçlarına benzerlik göstermektedir (1,15,19,20,24).

Bu aşamada taze spermada genellikle sadece Proteus-un üremesi, Aleem ve ark.'ın (1) tespit ettiği taze spermada görülen çok çeşitli mikroorganizmalardan farklılık göstermiştir. Ancak, taze spermada sadece bir çeşit mikroorganizmanın ürediğini gösteren Saika ve ark.'ın (23) çalışması, araştırmamızı destekler nitelikte görünmektedir. Bazı boğaların spermasında mantarın (Aspergillus) üremesi, bu konuda Gangadhar ve ark.'ın (17) çalışmalarının sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Araştırmamızın 2. aşamasında çalışılan 6 adet boğanın sulandırılmış spermasının hepsinde Escherchia türlerine rastlanması ve 5 adet boğada E.coli, 1 adet boğada da E.frondi izole edilmesi; E.coli'nin spermada en çok görülen mikroorganizma olduğunu vurgulayan birçok yayınlara paralellik göstermektedir (1,8,15,19,20,23,24).

Bu aşamada sulandırma sıvısının yapılan ekimleri sonucu tespit edilen streptokok diplokok, E.coli ve mayanın sulandırma sıvısının hazırlama aşamasında kullanılan toz Lachiphos-un kendisinden ya da su ve yumurta sarısından gelmiş olduğu düşünülebilir. Bu amaçla 3. aşamaya toz Laciphos'un bakteriyolojik muayenesi ilave edilmiştir.

3. aşama, 2 adet boğada 1. sulandırmanın sonunda alınan sperma numunesinin ve dondurulmuş spermanın ekimlerinden, hiçbir gram (+) ve (-) mikroorganizmanın ürememesi, sulandırıcıya katılan antibiyotiklerin, mevcut mikoflorayı inhibe ettiğini gösteren yayınları doğrular nitelikte görünmektedir (11,19,29).

Araştırmamızda çalışan toplam 14 adet boğaya ait spermaların hiçbirinde mikoplazma izole edilememiştir. Boğa spermalarında mikoplazmanın varlığını gösteren yayınların yanında, mikoplazma tespit edilememiş çalışmalar da mevcuttur. Fish ve ark.'ı (7) 45 adet boğanın spermasının yaklaşık % 30'unda mikoplazma tespit ederlerken bu oran Feses (6) tarafından yaklaşık % 25, Truscott ve Rhunco (27) tarafından yaklaşık % 33, Ungureanu ve ark.'ları (28) tarafından ise yaklaşık % 5 olarak bildirilmiştir. Gangadhar ve ark. ise (8) 46 adet boğanın spermasında hiç mikoplazmaya rastlamamışlardır. Çalışmamızın sonuçları bu araştırmacıların sonuçlarının bir kısmına ters düşerken bir kısmını ise doğrular niteliktedir

S O N U Ç L A R

Boğa spermasının tamamen mikroplardan arınmış olduğunu düşünerek, spermaları bu görüş açısı ile değerlendirmenin yanlış olduğu hatırdan çıkarılmamalıdır. Başka bir deyişle taze spermada tespit edilen bir miktar E.coli, proteus, mikrokokus gibi mikroorganizmalar o ejakulatın atılması gerektiği anlamına gelmemektedir. Ayrıca, spermaya işleme ve dondurma sırasında katılan antibiyotikler bu mikroorganizmaların üremesini inhibe etmektedirler.

Ancak, Brucella, Camphylobacteria, mikoplazma vs. gibi çeşitli patojen mikroorganizmaların boğa spermasında bulunmaması, bir hastalık kontrol programının önemli bölümünü oluşturabilir.

Ö Z E T

Bu çalışmada Tarım, Orman ve Köyleri Bakanlığı, istanbul il Müdürlüğü'ne bağlı Şenlikköy Sun'i Tohumlama İstasyonu'nda sperma vericisi olarak kullanılan ondört adet boğanın sperması, gram (+), gram (-) mikroorganizmalar ve mikoplazma yönünden incelenmiştir. Boğaların spermaları taze, sulandırılmış (Fransa'dan ithal edilen bir sulandırıcı ile) ve payet halinde dondurulmuş şekillerde mikrobiyolojik muayene için ayrı ayrı ekilmiştir.

Taze spermada yapılan ekimler sonucunda 5 boğada proteus spp. ve Aspergillus fumigatus üremiş, sulandırılmış spermada ise 6 boğadan E.coli, E.frondi ve Aspergillus fumigatus izole edilmiştir. Sulandırma sıvısında ise, E.coli, diplokok, streptokok ve maya tespit edilmiştir. İncelenen sperma numunelerinde mikoplazma izole edilememiştir.

S U M M A R Y

The semen samples collected from fourteen bulls in an Artificial Insemination Center in Türkiye were investigated for gram (+) and gram (-) microorganisms and mycoplasma. Semen samples were evaluated as fresh, diluted (with an extender imported France) and frozen in 0,25 ml PVC straws.

Proteus spp. and *Aspergillus* spp. were observed in semen samples from five bulls when fresh semen was studied. *E.coli*, *E.frondi* and *Aspergillus* spp. were isolated in diluted semen. *E.coli*, *Diplococ*, *Streptococ* and yeast were seen in diluting extender. No mycoplasma was found in the samples.

L İ T E R A T Ü R

- 1 - ALEEM, M., CHAUDHRY, R.A., NAEEM, U.K., RIZVI, A.U.R., AHMAD, R. (1990) : Occurrence of pathogenic bacteria in buffalo semen. *Buffalo J.* 6(1) 93-98.
- 2 - BEŞE, M. (1974) : Mikrobiyolojide kullanılan biyokimyasal testler ve besiyerleri, A. Ü. Vet. Fak. Yayınları 298. 208-209.
- 3 - BEŞE, M. (1974) : Mikrobiyolojide kullanılan biyokimyasal testler ve besiyerleri. A. Ü. Vet. Fak. Yayınları 298. 397-398.
- 4 - BORYCZKO, Z., KAHN, W., VELEZ, G. (1985) : Effect of bacteria in bull semen on the motility of spermatozoa and on their ATP and ADP content. *Zuchthygiene* 20(5). (abs).
- 5 - ERDAĞ, O., TÜRKASLAN, J. (1989) : Pendik Hayvan Hast. Merk. Araşt. Ens. Dergisi. XIX (1-2) 85-97.
- 6 - FEJES, J. (1986) : Pathological changes in the genital system of breeding bulls with mycoplasmas in semen. *Vet. bulletin.* 7234. (abs).
- 7 - FISH, N.A., ROSENDAL, S., MILLER, R.B. (1985) : The distribution of mycoplasmas and ureaplasmas in the genital tract of normal artificial insemination bulls. *Can. Vet. J.* 26. 13-15.
- 8 - GANGADHAR, K.S., RAV, R.V., KRISHNASWAMY, S., RAO S.U. (1986) : Bacterial and fungal types and their load in the frozen semen of buffalo bulls. *Indian Vet. J.* 63 (1) 48-53.
- 9 - GOURLAY, R.N. (1973) : Significance of mycoplasma infections in cattle. *J.A.V.M.A.* 163. 905-909.
- 10 - GÖZÜ, M. (1983) : Boyama yöntemleri. *Pendik Vet. Kont. ve Araş. Ens. Yayınları.* No. 7. 243-246.
- 11 - HAMDY, A.H., MILLER, C.C. (1971) : Antibiotics for bovine mycoplasma. *J. Dairy Sci.* 54. 1541-1544.
- 12 - HOTZEL, H., SACHSE, K., PFUTZNER, H. (1990) : DNA probes for the detection of mycoplasma bovis and Mycoplasma genitalium. *IOM. letters.* vol. 1. 384-385.
- 13 - LAFANUE, N.A., MCENTEE, K. (1982) : Experimental Mycoplasma bovis seminal vesiculitis in the bull. *The Cornell Vet.* 72.150-167.

- 14 - LANGFORD, E.V. (1951) : Mycoplasma species recovered from the reproductive tracts of Western Canadian Cows. *Can. J. Comp. Med.* 39 133-138.
- 15 - MARINOV, P., BOHNEL, H. (1974) : Hygienic conditions of materials for freezing bovine semen. *J. Dairy Sc.* 57: 6.707-711.
- 16 - NATALIA, L. (1986) : Yeast flora of bull smen. *Vet. Bulletin.* 4995. (abs).
- 17 - NIMAI, S., SINHA, A.K., BALRAJ, S., SINGH, L.C., TIWARY, D.K., SINGH, M.P. (1990): Efficacy of specific antibiotics on microbial load chilled and frozen semen of crossbred bulls. *Vet. Bulletin.* 2355 (abs).
- 18 - ONOVIRAN, O., TRRUSCOTT, R.B., FISH, N.A., BARKER, C., RUHNKE, H.L. (1975) : The recovery of mycoplasmas from genital tracts of bulls in artifivial breeding units in Ontario. *J. Comp.Med.* 39. 474-475.
- 19 - PAREZ, M., GUERIN, B. (1983) : Sanitary and hygienic procedures for controlling ubiquitous bacteira. *Laboratuire pour le controle des reproducteurs.* France. 43-49.
- 20 - PARSONSON, I.M., HAL, C.E., SETTERGREN I. (1971) : A metod for the çollection of bovine seminal vesicle seciretions for microbiologic examination. *J.A.V.M.A.* 158(2) 175-177.
- 21 - ROSENBUSCH, R. (1990) : Mycoplasmas as agents of bovine disease. *IOM letters.* Vol. 1178-179.
- 22 - SAED, O.M., AL-AUBAIDI, J.M. (1983) : Infertility in heifers caused by pathogenic strain of mycoplasma bovigenitalium. *Cornell Vet.* 73. 125-130.
- 23 - SAIKA, G.K., BORO, B.R., HAZARIKA, A.K., AHMED, K. (1987) : Bacterial flora of bovine semen and their antibiotic sensivity pattern. *Indian Vet. Med. J.* 11(1) 37-39.
- 24 - STALHEIM, O.H.V. (1983) : Standardized microbiological tests for the international exchange at animal genetic material. *National Animal Disease Center.* Iowa. 1-4.
- 25 - STOYANOV, T. (1985) : Reproducüive analysis of microbial contemination in samples of seminal fluid from breeding bulls. *Vet. Bulletin.* 1101. (abs).
- 26 - THOMAS, C.B., WOLFGRAM, L.J., SHARP, P. (1990) : Bovine Neutrophil Chemiluminescence is suressed by Mycoplasma bovis. *IOM letters.* Vol. 1. 341-342.
- 27 - TRUSCOTT, R.B., RUHNKE, H.L. (1983) : Control of Mycoplasma and Ureaplasma in semen. *Atlantic Area Laboratory, Agriculture Canada.* 50-63.
- 28 - UNGUREANI, C., GRIGORE, C., IONITA, I.F., CONSTANTINESCU. (1986) : Frequency of mycoplasmae in the semen of reproduction bulls. *Archiv Für Experimentelle Veterinarmedizin.* 40(1) (abs).
- 29 - ZAUGG, N.L., ALMQUIST, J.O. (1973) : Mobility of spermatozoa and control of bacteria in bovine semen containing penicillin and neomycin or epicillin. *J.Dairy sci.* 56: 202-206.