

## SAĞLIKLI BOĞALARIN SPERMALARINDAN AEROBİK BAKTERİ İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

The identification and isolation of aerobic bacteria in semen of healthy bulls.

Hakan YARDIMCI (x) Aydın AKSU (xx) Belgin ERDEM (x)

### ÖZET

Bu çalışmada, değişik ırklarda sağlıklı boğaların spermalarındaki bakteri tipleri saptanmaya çalışılmıştır. Bunun için, Holstein, Esmer, Jersey, Simmental, Brangus ve Limousin ırklarında toplam 55 sağlıklı damızlık boğa kullanılmış ve steril sun'i vajenler yardımıyla sperma örnekleri toplanmıştır. Toplanan 55 örnekten uygun besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Aerobik koşullarda 37°C'de 4 gün inkübe edilen besi yerleri hergün kontrol edilerek üreyen kolonilerin identifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Sperma örneklerinin yapılan aerobik bakteriyolojik muayenelerinde toplam 61 bakteri izole edilmiştir. İzolatların sayısı ve oranları; Bacillus sp. 20(%32.8), Micrococcus sp. 11(% 18.0), S. epidermidis 10 (% 16.4), Streptococcus sp. 7 (% 11.5) ve Coryne bacterium sp. 5(%8.2) olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, sağlıklı boğaların spermasında potansiyel patojen nitelikli bakterilerin de bulunabileceği düşünülerek damızlık boğaların veya bunların spermalarının mikrobiyolojik kontrollerinin yapılmadan kullanılmaması ve hijyenik önlemlerin alınması gereği anlaşılmıştır.

### SUMMARY

In this study, the types of bacteria in semen of healthy bulls of various races were investigated. A total of 55 healthy bulls of Holstein, Swiss Brown, Jersey, Simmental, Limousin and Brangus races have been used and semen samples have been collected by the help of sterile artificial vaginas.

55 semen samples have been inoculated in convenient media. Agar plates were incubated at 37 °C for 4 days in aerobic conditions with daily examinations and the colonies grew on them were identified.

61 bacteria were isolated in aerobic bacterial examinations of semen samples. Numbers and rates of isolated bacteria were established as Bacillus sp. 20 (32.8 %), Micrococcus sp. 11(18.0 %), S. epidermidis 10 (16.4 %), E.coli 8(13.1), Streptococcus sp. 7 (11.5 %) and Corynebacterium sp. 5 (8.2 %), respectively.

As a result, it was concluded that, potentially pathogen bacteria can be found in semen of healthy bulls, so it has been understood that bulls or their semen can not be used without a microbiological confirmation and hygienic protection should be taken.

## GİRİŞ

Boğalarda döl verimi düşüklüğü önemli bir sorundur. Bu sorunu değişik faktörler (genetik, beslenme, yetiştirici hataları, bazı infeksiyonlar, vs.) ortaya çıkarmaktadır. Döl verimini etkileyen önemli infeksiyöz nitelikli bakteriyel hastalık etkenleri (Campylobacter, Brucella, vs.) dışında, sağlıklı boğaların spermalarında da potansiyel patojen durumda çoğu aerobik ve oportunistik karakterde bakteriler bulunmaktadır (7).

Sağlıklı boğaların spermalarındaki bakterilerin ana kaynağı prepusyumdur ve genellikle sperma bu bakterilerle ejakulasyon sırasında kontamine olur (1). Kontaminasyonun diğer kaynakları; gaita, genital kanaldaki yangısal odaklar, sperma toplama ve işleme ekipmanları, hayvan bakıcıları, laboratuvar personeli ve sperma sulandırıcılarıdır (10). Potansiyel patojen olarak da nitelendirilen ve klinik olarak sağlıklı boğaların spermalarından izole edilen bu bakterilerin dölverimi üzerine etkisi henüz tam olarak açıklanamamıştır (1). Bu güne kadar yapılan çalışmalarda sağlıklı boğaların spermalarından Ps. aeroginosa, Corynebacterium sp., C.renale, Staphylococcus sp., Streptococcus sp., E.coli., Bacillus sp., Micrococcus sp., Proteus sp., Citrobacter sp., Chromobacter sp., Aerobacter sp., Alcaligenes sp., Flavobacterium sp., Herella sp., Nocardia sp. ve Sarcinia sp. gibi aerobik bakterilerin izolasyonu yapılmıştır (7,12,13,14). İzolasyonlarda genellikle % 5 defibrine koyun kanlı Trypticase

Soy Agar kullanılmıştır (7). Meredith ve ark. (11) sağlıklı boğaların spermalarından *Chromobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *E.coli*, *Proteus* sp., *Ps. aeruginosa*, *Staphylococcus* sp. ve *Streptococcus* sp. bakterilerini izole etmişlerdir.

Bartlett ve ark (4) ise, spermasında kontaminant olarak bulunan bakterilerin boğaların çevresinden ve laboratuvarlardan bulaşabileceğine işaret ederek *Ps. aeruginosa*, *C. pyogenes*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., ve *E. coli* bakterilerini izole etmişlerdir. Wierzbowski ve ark. (15), Yaptıkları çalışmada, sperma sıvısında bulunan *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Ps. aeruginosa*, *E.coli* ve *Bacillus*'ların progresif hareket yeteneğine sahip spermatozoonların sayı ve yaşam sürelerinde azalmaya neden olduğunu ortaya koymuşlardır.

Türkiye'de konu ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır. Sevinç ve ark. (14), sun'i tohumlama istasyonlarındaki boğaların sperma ve prepusyal yıkantılarının bakteriyel florası üzerinde çalışmışlar ve inceledikleri sperma ve prepusyal yıkantı örneklerinde *Pr. Vulgaris*, *Pr. mirabilis*, *Corynebacterium* sp., *C. renale*. ve *E.coli* saptamışlardır. Aydın ve ark (3) boğa spermasının bakteriyel florası ve antibiyotik duyarlılığını inceledikleri çalışmalarında; *S. epidermidis*, *C.renale*, *E.coli*, *Serratia marcescens* ve *Corynebacterium* sp. bakterilerini izole ve idenfiye etmişlerdir. Güneyi (8), boğaların prepusyel sıvı ve spermalarından bakteriyel etkenlerin izolasyonu ve bunların antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine yaptığı araştırmada, dondurulmuş ve sulandırılmış sperma örneklerinde *Staphylococcus* sp., *E.coli*, *Proteus* sp. etkenlerini izole etmişlerdir.

Türkiye'de damızlık olarak kullanılan boğa spermalarının bakteriyolojik kontrolü ile ilgili herhangi bir zorunluluk olmamasına karşın hayvancılık bakımından gelişmiş ülkelerde, taşınması muhtemel mikroorganizmalar yönünden sperma kontrolleri sun'i tohumlama istasyonlarında veya belirli merkezlerde aylık olarak yapılmaktadır (14).

Bu çalışmada, dölverimi sorunu olmayan değişik ırklardaki, sağlıklı görünümlü, damızlık boğaların spermalarının aerobik olarak bakteriyolojik yoklamanın yapılarak, spermadaki bakteriyel florayı belirlemek amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOD

### **Damızlık Boğalar**

Çalışmada sperma kaynağı olarak değişik ırklarda, dölverimi sorunu olmayan 55 adet sağlıklı damızlık boğadan yararlanılmıştır. (Tablo-1)

### **Sun'i Vajen**

Spermanın toplanmasında rutin sperma toplama işleminde kullanılan sterilize edilmiş sun'i vajenlerden yararlanılmıştır.

### **Besiyerleri**

Bakterilerin üretilmeleri ve idenfikasyonlarında % 5 defibrine koyun kanlı Trypticase Soy Agar, Mac Conkey Agar, Nutrient ve Serumlu Buyyon kullanılmıştır.

### **Spermanın Toplanması**

Sperma her hayvan için ayrı bir steril sun'i vajen kullanılarak usulüne uygun olarak toplanmış ve steril tüplere 1 ml miktarında aktararak + 4°C' de, termoslarla laboratuvara ulaştırılmıştır.

### **İzolasyon Çalışmaları**

Laboratuvara getirilen sperma örnekleri % 5 defibrine koyun kanlı Trypticase Soy Agar' a direkt ve 1/10 sulandırılarak 0.1 ml. ekilmiş ve petriler 37°C' de 4 gün aerobik olarak inkubasyona bırakılmıştır. Üreme durumu her gün kontrol edilerek koloniler subkültüre edilmiştir.

### **İdenfikasyon Çalışmaları**

Üreyen kolonilerden, Gram boyama yapılarak bakterilerin Gram boyama özellikleri ve morfolojileri belirlenmiştir.

Lam lamel arası ve yarıkağı besiyerinde hareket muayenesi yapılarak bakterilerin bu özellikleri kaydedilmiştir. (2)

Bakterilerin Mac Conkey agar'da üreme, oksidaz, katalaz, oksidasyon/fermentasyon, kaogulaz, H<sub>2</sub>S üretimi, nitrat redüksiyonu gibi biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi yanında karbonhidratlara (laktoz, glikoz, sakkaroz, vs.) etkileri de saptanmıştır(5).

## BULGULAR

Sağlıklı 55 boğadan alınan sperma örneklerinden izole ve identifiye edilen bakterilerin % oranları Tablo-2'de gösterilmiştir. İncelenen örneklerde Bacillus sp. 20(%32.8), Micrococcus sp.11(%18.0), S.epidermidis 10 (%16.4), E.coli 8(%13.1), Streptococcus sp.7(%11.5) ve Corynebacterium sp.5(%8.2) bulunmuştur.

İzole ve identifiye edilen etkenlerin Holstein, Esmer ve diğer ırklara (Jersey, Simmental, Brangus ve Limousin) göre dağılımları Tablo3,4 ve 5'te gösterilmiştir.

**Tablo-1: Çalışmada kullanılan Damızlık Boğaların İrkları ve Sayıları.**

Boğa Irkı	Boğa Sayısı
Holstein	29
Esmer	17
Jersey	4
Simmental	3
Brangus	1
Limousin	1
<b>TOPLAM:</b>	<b>55</b>

**Tablo-2: 55 Damızlık Boğa Spermasından İzole ve İdentifiye Edilen Bakteri Türleri ve % Oranları**

Bakteri Türü	İzolat	
	Sayısı	%
Bacillus sp.	20	32.8
Micrococcus sp.	11	18.0
S. epidermidis	10	16.4
E. coli	8	13.1
Streptococcus sp.	7	11.5
Corynebacterium sp.	5	8.2
<b>TOPLAM</b>	<b>61</b>	<b>100.0</b>

**Tablo-3. Holstein Irkı Boğaların Spermalarında İzole ve İdentifiye Edilen Bakteri Türleri ve % Oranları**

Bakteri Türü	İzolat	
	Sayısı	%
Bacillus sp.	13	40.6
Micrococcus sp.	7	21.9
Streptococcus sp.	5	15.6
S. epidermidis	4	12.5
Corynebacterium sp.	2	6.3
E. coli	1	3.1
<b>TOPLAM</b>	<b>32</b>	<b>100.0</b>

**Tablo-4: Esmer Irkı Boğaların Spermalarından İzole ve İdentifiye Edilen Bakteri Türleri ve % Oranları**

Bakteri Türü	İzolat	
	Sayısı	%
E. coli	5	27.8
Bacillus sp.	4	22.2
Micrococcus sp.	3	16.7
S. epidermidis	3	16.7
Corynebacterium sp.	2	11.1
Streptococcus sp.	1	5.5
<b>TOPLAM</b>	<b>18</b>	<b>100.0</b>

**Tablo-5: Jersey, Simmental, Brangus ve Limousin Irkı Boğaların Spermalarında İzole ve İdentifiye Edilen Bakteri Türleri ve % Oranları**

Bakteri Türü	İzolat	
	Sayısı	%
Bacillus sp.	3	27.3
S. epidermidis	3	27.3
E. Coli	2	18.1
Streptococcus sp.	1	9.1
Corynebacterium sp.	1	9.1
Micrococcus sp.	1	9.1
<b>TOPLAM</b>	<b>11</b>	<b>100.0</b>

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Boğalarda dölverimi düşüklüğünün başlıca nedenlerinden biri de bakteriyel hastalıklardır. Hastalıklı hayvanlardan izole edilen Brucella, Campylobacter, Leptospira, Mycoplasma gibi patojenik bakteriler dışında sağlıklı hayvanların spermasından da oportunistik bazı bakteriler izole edilmektedir. Çoğu aerobik özellikte olan bu etkenler üzerinde yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada 55 sağlıklı boğanın spermasında bakteriyolojik muayenelerle aerobik floranın saptanmasına çalışılmıştır. Ayrıca, izole ve identifiye edilen etkenler ırklara görede incelenmiştir.

Brown ve ark (6), Yeni Zellanda'da 42 boğa sperma örneğinin bakteriyel florasını incelediklerinde; Bacillus, Corynebacterium ve Micrococcus cinsine ait olanların çoğunluğunu oluşturduğunu saptamışlardır. Sevinç ve ark.(14), sun'i tohumlama istasyonlarındaki 32 boğa ile yaptıkları çalışmada izole ettikleri etkenleri sırasıyla Pr. vulgaris %23.6, C.renale %15.0, S.epidermidis %6.5, Corynebacterium sp. %5.37, E.coli %3.22 ve S.aureus %3.22 olarak bulmuşlardır. Aydın ve ark.'nın (3), 5 esmer ırk boğa ile yaptıkları çalışmada gerek düşük düzeyde antibiyotik katılmış sperma örneklerinde ve gerekse antibiyotiksiz olan kontrol örneklerinde S.epidermidis , Corynebacterium sp. ve C.renale ilk sıralarda görülmekle birlikte E.coli ve Serratia marcescens de izole

edilen etkenler arasındadır. Hossain ve ark.(9), Bangladeşte yaptıkları araştırmada boğa spermasından izole ettikleri farklı bakteri tiplerini sırasıyla *E.coli* %11.9, *Ps.aeruginosa* %9.2, *C. pyogenes* %5.5, *Str.haemolytica* %4.3, *S.aureus* %3.8 ve identifiye edilmeyen Gram negatif basil %2.1 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada hemen hemen aynı bakteri tipleri izole edilmiş ise de izolasyon oranları farklı olarak bulunmuştur. Nitekim, araştırmada, sırasıyla, *Bacillus sp.* %32.8, *Micrococcus sp.* %18.0, *S.Epidermidis* %16.4, *E.coli* %13.1, *Streptococcus sp.* %11.5 ve *Corynebacterium sp.* %8.2 izole edilmiştir. Bu sonuçlar benzer araştırma sonuçları ile paralellik göstermekte, ancak izolasyon yüzdelerinde farklılıklar bulunmaktadır.

İrk düzeyinde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Aydın ve ark'nın (3), bu konu ile ilgili araştırmalarında 5 esmer sığır spermasından *S.epidermidis*, *C.renale*, *E.coli*, *Serratia marcescens* ve *Corynebacterium sp.* izole ettikleri bildirilmiştir. Bu çalışmada da 17 esmer sığır spermasından sırasıyla *E. coli* 5(%27.8), *Bacillus sp.* 4(%22.2), *Micrococcus sp* 3(%16.7), *S.Epidermidis* 3(%16.7), *Corynebacterium sp.* 2(%11.1) ve *Streptococcus sp.* 1(%5.5) adet izole edilmiştir. Bu sonuca göre; ırk düzeyinde, boğalardan izole edilen etkenlerin farklı oranlarda olduğu görülmektedir.

Sağlıklı boğa spermalarıyla yapılan bu çalışmada boğa spermasının aerobik bakteriyolojik yoklamasında birçok potansiyel patojen etkenin (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *E.coli* vs.) izole edildiği görülmüştür. Daha önce yapılan araştırmalarda da buna benzer etkenlerin izole edildiği görülmüştür. Daha önce yapılan araştırmalarda da buna benzer etkenlerin izole edildiği dikkate alınır, sağlıklı hayvanlar için bir kontrol mekanizması olması gerektiği anlaşılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde olan bu sistem Türkiye'de henüz yoktur.

Hijyen ve bakımın bir ölçüde kontaminasyonu azaltabileceği düşünülürse de tamamen ortadan kaldırılması imkansızdır. Ayrıca, sun'i tohumlama için kullanılan spermalara antibiyotik katılmasının dirençli suşlar geliştirebileceği göz önüne alınacak olursa, periyodik olarak spermada yapılacak bakteriyolojik yoklamaların düzenli bir kontrol olanağı sağlayacağı bir gerçektir.

Sonuç olarak, sağlıklı boğaların spermalarında potansiyel patojenik nitelikli bakterilerin de bulunabileceği düşünülerek damızlık boğaların veya bunların spermalarının mikrobiyolojik kontrollerinin yapılmadan kullanılması ve hijyenik önlemlerin alınması gerektiği anlaşılmıştır.



## KAYNAKLAR

- 1- ANON (1981): Disease control in semen and embryos. FAO animal production and health paper. No.23,Rome.
2. ARDA,M. (1978): Genel Bakteriyoloji . A.Ü.Vet.Fak. Yay., No.342.
3. Aydın, N.,Tekin, N., Yurdaydın, N. ve Sevinç,A. (1984): Boğa spermasındaki bakteriyal floraya chloramphenicol ve ampiciline'in etkisi. A.Ü.Vet. Fak. Derg., 31 (2): 346-352.
4. Barlett, D.E., Larson,L.L., Parker,W.G. and Howard, T.H. (1976): Specific pathogen free (SPF) frozen bovine semen:a goal? Proceedings of the sixth technical conference on artificial insemination and reproduction. Proc. 6 th. Tech. Conf. Nat. Assoc. An. Breeders. USA.pp. 11-12.
5. Beşe.M. (1974): Mikrobiyolojide kullanılan biyokimyasal testler ve besiyerleri. A.Ü.Vet. Fak. Yay., No. 298. A.Ü Basımevi, Ankara.
6. Brown, V.G., Schlollum, L.M. and Jarvis, B.D.W. (1974): Microbiology of bovine semen and artificial breeding practices under New Zeland conditions. N.Z.J. Agr. Res. , 17(4): 431-442.
7. Eaglesome, M.D., Garcia, M.M. and Stewart, R.B. (1992): Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen Part II. Heamophilus somnus, Mycoplasma spp and ureaplasma spp, Chlamydia; pathoges and semen contaminants; treatment of bull semen with antimicrobial agents. Vet. Bul., 62(9): 887-910
8. Güneyi,F. (1992): Boğaların prepusiyel sıvı ve spermalarından bakteriyal etkenlerin izolasyonu ve bunların antibiyotiklere duyarlılıkları. Tarım Ve Köyışleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Uzmanlık Tezi, İstanbul.
9. Hossain, M.F., Alam, M.G.S., Ahmet, J.U., Rahman, M.M. and Rahman, A. (1990): Bacreteriological examination of semen as an aid to sexual healt control in bulls. Bangladesh J. Microbiol., 7(2):85-88.
10. Marinov, P.and Bohnel, H. (1974): Hygienic conditions of materials for freezing bovine semen. J. Dairy Sci., 57(6): 707-711
11. Meredith, M.J. (1970): Bacterial content of semen, collected by artificial vagina from bulls that evert the preputial epithelium. Vet. Rec., 87: 122-124.
12. Prince,P.W., Almquist, J.O. and Reid, J.J. (1949): Bacteriological studies of bovine semen. II. The incidence of specific types of bacteria and the

relation to fertility. J. Dairy Sci., 32: 849-855.

13. Saika, G.K., Boro, B.R., Hazarika, A.K. and Ahmad, K. (1987): Bacterial flora of semen and their antibiotic sensitivity pattern. Indian Vet. Med.J., 11:137-139.

14. Sevinç,A., İstanbulluoğlu, E. ve Yuraydın,N. (1983): Suni tohumlama istasyonlarındaki boğaların sperma ve prepusyal yıkantılarının bakteriyel florası üzerinde çalışmalar. Doğa Bil. Derg., 7: 185-188.

15. Wierzbowski, S. Nowakowski, W., Furowics, A. and Heczko, P. (1980): Biochemical and toxic properties of potentially pathogenic microorganisms isolated from bull semen. 9 th Int. Cong. on Animal Repr., No. 221, Spain.