

BOĞA SPERMASINDAKİ BAKTERİYEL FLORAYA CHLORAMPHENICOL VE
AMPICILLINE'İN ETKİSİ

Nejat Aydın¹ Necmettin Tekin² Nafiz Yurdaydın³ Afif Sevinç⁴

The effect of chloramphenicol and ampicilline on semen bacterial flora.

Summary: *The effect of ampicilline and chloramphenicol on bacterial flora and sperm motility was investigated.*

Split ejaculates diluted in egg-yolk-citrate extender having 50,100, 200,400,800 and 1000 mcg/ml of these antibiotics were subjected to laboratory test to determine the bacterial flora in semen samples and their sensitivity to ampicilline and chloramphenicol. Staph. eidermidis, C. renale, E. coli, Serratia marcescens and Corynebacterium sp. were isolated and identified in the diluted split ejaculates samples having different level of antibiotics.

All types of bacteria found in this study were sensitive both to ampicilline and chloramphenicol above the level of 400 mcg/ml and no revers effect was observed on sperm motility.

Özet: *Bu araştırmada, Sodyum Sitrat + Yumurta Sarısı ile sulandırılmış boğa spermasına katılan ampicilline ve chloramphenicol'un bakteriyel flora niteliğine olan etkileri inceledi.*

Bu antibiyotikler sulandırılmış boğa spermasının ml sine 50, 100, 200,400,800,1000 mcg düşecek düzeyde katıldı.

Bu düzeylerde antibiyotik içeren örneklerden yapılan ekimler sonunda 400 mcg/ml üstündeki dozaj düzeylerinde bakteriyel üremenin olmadığı saptanmıştır.

Değişik düzeylerde antibiyotik içeren sperma örneklerinden uygun besi yerlerine yapılan ekimler sonucu Staph. epidermidis, C. renale, E.

1 Doç. Dr. A.Ü. Vet. Fakültesi Bakteriyoloji Bilim Dalı, Ankara

2,3 Dr. Med. Vet. A.Ü. Vet. Fakültesi Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, Ankara.

4 Prof. Dr. A.Ü. Vet. Fakültesi Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, Ankara.

coli, *Serratia marcescens* ve *Corynebacterium sp.* mikroorganizmaları izole ve identifiye edilmiştir.

Sonuç olarak sulandırılmış boğa spermalarına 400 mcg/ml. dan fazla, 1000 mcg'a kadar ampicilline veya chloramphenicol katılmasının spermatozoa motilitesini bozmadığı ve bakteriyel üremeyi durdurduğu anlaşılmıştır.

Giriş

Sığır seminal plazmasının yapısında doğal inhibitörler bulunmakta ve sperma florasında bulunan birçok bakteri türüne karşı etkili olmaktadır. Bu inhibitör maddelerin varlığı nedeniyle bakterilerin çoğunluğu seminal plazma içinde çoğalma olanağı bulamamakta ve buna bağlı olarak da spermada geçici bir bakteri popülasyonu oluşmamaktadır. Ancak sun'i tohumlama uygulamalarında sperma sulandırıldığından ve bu inhibitörlerin nisbi yoğunluğu düştüğünden etkinlikleri kaybolmaktadır.

Bu nedenle sun'i tohumlamada kullanılacak erkek damızlıkların spermasında ve dişilerin de dölerme organlarında bulunması olası bakteriyel flora ile bakteriyel kontaminasyonlara karşı sperma sulandırıcılarına genellikle penicilline ve streptomycine gibi belirli antibiyotikler katılmaktadır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarla bakterilerde antibiyotiklere karşı güçlü bir dirençliliğin olduğu anlaşılmış ve bu dirençliliğin bir kısmının yaygın bir karakter gösterdiği belirlenmiştir. Buna bağlı olarak Redy ve ark. (7) ile Kuradshii (6), sperma sulandırıcılarına katılan antibiyotiklerin yeterince etkili olmadığı ve gitgide artan dirençli flora nedeniyle istenilen randımanın elde edilmediğini açıklamışlardır.

Bazı bakterilerin değişik antibakteriyel ilaçlara direnç göstermeleri nedeniyle sun'i tohumlama uygulamalarında bu hususa özen gösterilmesine bazı araştırmacılar (8,9) değinmişlerdir.

Sperma sulandırıcısına katılan penicilline ve streptomycine'in etkisinin azaldığı anlaşıldıktan sonra spermadan izole edilen bakterilerin değişik antibiyotiklere duyarlılıkları incelenmiş ve yapılan bir çalışmada amino-glikozit olan dibakasin, amikasin ve gentamisin'in en etkili oldukları ortaya konulmuştur. Nitekim yapılan bir araştırmada araştırmacılar (9), dibekasin'in sperma sulandırıcılarına 100 mcg/ml katılmasıyla 15 °C de 1 hafta tutulmakla bakteriyel üremeyi önlediğini bildirmişlerdir.

Brown ve ark. (3) da, spermada bulunan doğal inhibitörlerin etkinliklerini zamanla kaybettiklerini ve bu nedenle bakteriyel kontaminasyonlara ve belirli mikroorganizmalara karşı etkili antibiyotiklerin sperma sulandırıcısına katılabileceğini belirlemişlerdir.

Öteyandan, Sevinç ve ark. (8) yaptıkları bir araştırmada incelenen 32 boğaya ait toplam 93 sperma örneğinde *Pr. vulgaris* (% 23.6), *C. renale* (% 15), *Staph. epidermidis* (% 6.5), *Corynebacterium* sp. (% 5.3), *E. coli* (% 3.2) ve *Staph. aureus* (% 3.2) izole ve identifiye etmişlerdir. Araştırmacılar izole ve identifiye edilen bu etkenlere karşı uygulanan antibiyotik duyarlılık testlerinde en etkili antibiyotiklerin chloramphenicol ve ampicilline olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışma, söz konusu antibiyotiklerin ileride dondurulup tohumlamada kullanılacak sulandırılmış boğa spermalarında hangi bakterilere ve ne ölçüde etkili olduğunun araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Sperma örnekleri: Araştırmada kullanılan sperma örnekleri Lalahan Veteriner Zootečni Araştırma Enstitüsünün 5 Esmer ırk boğasından sun'i vajen yöntemiyle alınmıştır. Alınan ejakülatların gerekli spermatolojik muayeneleri yapıldıktan sonra, tohumlamada kullanılabilir nitelikteki ejakülatlar Sodium Sitrat-Yumurta Sarısı ile bir tohumlama dozunda 30×10^6 motil spermatozoa bulunacak biçimde sulandırılmıştır.

Spermaya katılan antibiyotikler: Denemelerde kullanılan antibiyotiklerden ticari tipteki chloramphenicol ve ampicilline Doğu İlaç Fabrikasından sağlanmıştır. Chloramphenicol 1 ml'sinde 200.000 mcg ve ampicilline ise 1 ml'sinde 125.000 mcg etkin madde içermekteydi. Bu antibiyotiklerin herbirinden, her boğanın sulandırılmış split ejakülatlarının ml'sine 50,100,200,400,500,800,1000 mcg düşecek düzeyde katılmış, ayrıca antibiyotik katılmamış bir bölüm kontrol olarak tutulmuştur.

İzolasyon Çalışmaları: İzolasyon besi yeri olarak zenginleştirilmiş kanlı agar, Mac Conkey agar, Brucella agar (Difco), Campylobacter besi yeri gibi katı ortamlar ile buyyon ve serumlu buyyon gibi sıvı besi yerlerinden yararlanılmıştır. Besi yerleri Arda (1978), Butzler ve ark. (1973)'na göre hazırlanmıştır.

Biyokimyasal testler: İzole edilen bakterilerin identifikasyonunda çeşitli biyokimyasal, testlerden yararlanılmıştır. Test yöntemleri Beşe (2) ve Cowan ve ark. (1974)'na göre uygulanmıştır.

Bulgular

Denemelerin ilk aşamasında iki boğadan alınan değişik oranlarda antibiyotik katılmış ve antibiyotik katılmamış sperma örneklerinden besi yerlerine yapılan ekimlerde gerek chloramphenicol ve gerekse ampicilline katılan örneklerde (50,100,200,400 mcg/ml) 48. saatte üreme görülmüş ve üreyen mikroorganizma türleri ve antibiyotikli örneklerin içeriği tablo-1'de gösterilmiştir. Daha sonra aynı boğa spermalarında antibiyotik miktarları yükseltilmiş ve alınan sonuçlar tablo-2'de gösterilmiştir. Tablo'dan görüleceği gibi, her iki antibiyotiğin 400 mcg/ml düzeyinin üstünde, 1000 mcg kadar katılmasıyla üremenin olmadığı gözlenmiştir. Ancak, kontrol örneklerinden üreme saptanmıştır. Beş boğadan alınan 500 mcg/ml miktar ampicilline ve chloramphenicol katılmış sperma örneklerinin bakteriyolojik yoklamalarında 72. saatte hiç bir üremenin olmadığı gözlenmiş olup sonuçlar tablo 3'de gösterilmiştir. Gerek düşük düzeyde antibiyotik katılmış sperma örnekleri ve gerekse antibiyotiksiz olan kontrol örneklerinde *Staph. epidermidis*, *Corynebacterium* sp. ve *C. renale* ilk sırada görülmekle birlikte *E. coli* ve *Serratia marcescens*'de izole edilen etkenler kenler arasındadır.

Tablo 1: Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü'ne ait iki esmer boğanın antibiyotikli ve antibiyotiksiz (kontrol) sperma örneklerinde antibiyotik etkinliği ve izolasyon sonuçları.

Antibiyotik çeşidi	Boğa no:	Katılan antibiyotik miktarı (mcg/ml)	Üremenin kontrol edildiği saatler			Mikroorganizma türü
			24	48	72	
Ampicilline	31 /80	50	-	+	+	C. renale, Staph. epidermidis, E. coli, Serratia marcescens
		100	-	+	+	
	42 /80	200	-	+	+	
		400	-	+	+	
		Kontrol	+	+	+	
Chloramphenicol	31 /80	50	-	+	+	
	42 /80	100	-	+	+	
		200	-	+	+	
		400	-	+	+	
		Kontrol	+	+	+	

(-): Üreme yok

(+): Üreme var

Tablo 2: Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsü'ne ait iki esmer boğanın antibiyotikli ve antibiyotiksiz (kontrol) sperma örneklerinde antibiyotik etkinliği ve izolasyon sonuçları.

Antibiyotik çeşidi	Boğa no:	Katılan antibiyotik miktarı (mcg /ml.)	Üremenin kontrol edildiği saatler			Mikroorganizma türü
			24	48	72	
Ampicilline	31 /80	500	—	—	—	Corynbacterium sp., C. renale, Staph. epidermidis
	42 /80	800	—	—	—	
		1000	—	—	—	
		Kontrol	+	+	+	
Chloramphenicol	31 /80	500	—	—	—	
	42 /80	800	—	—	—	
		1000	—	—	—	
		Kontrol	+	+	+	

(—): Üreme yok

(+) : Üreme var

Tablo 3: Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsü'ne ait beş esmer boğanın antibiyotikli ve antibiyotiksiz (kontrol) sperma örneklerinde antibiyotik etkinliği ve izolasyon sonuçları.

Antibiyotik çeşidi	Boğa no:	Katılan antibiyotik miktarı (mcg /ml.)	Üremenin kontrol edildiği saatler			Mikroorganizma türü
			24	48	72	
Ampicilline	31 /80	500	—	—	—	Corynbacterium sp., Staph. epidermidis., E. coli
	42 /80	Kontrol	+	+	+	
	44 /80					
	412 /81					
	61 /81					
Chloramphenicol	31 /80	500	—	—	—	
	42 /80	Kontrol	+	+	+	
	44 /80					
	412 /81					
	61 /81					

(—): Üreme yok

(+) : Üreme var

Tartışma ve Sonuç

Sperma sulandırıcıları içine yakın zamana kadar penicilline ve streptomycine gibi belirli antibiyotikler katılmaktaydı fakat bazı bakterilerin değişik antibakteriyel ilaçlara direnç göstermeleri nedeniyle suni tohumlama uygulamalarında bu hususa özen gösterilmeye başlanmış ve adı geçen antibiyotiklerin dışında başka antibiyotiklerin etki-

leri de incelenmiştir (3,7,8,9). Bu çalışmada, sperma florası üzerine etkin olduğu araştırmacılar tarafından bildirilen antibiyotiklerden ampicilline ve chloramphenicol kullanılarak yapılan incelemeler sonucunda bu antibiyotiklerin sperma örneklerinde bulunabilecek mikroorganizmalar üzerine etkili oldukları ortaya konulmuştur.

Ayrıca bu çalışmada elde edilen sonuçlar, boğa spermalarında bulunabilecek mikroorganizmalar üzerine ampicilline ve chloramphenicol'un en etkili antibiyotikler olduğunu saptayan Sevinç ve ark. (8)'nin bulgularını da doğrulamıştır. Lalahan Veteriner Zootehni Araştırma Enstitüsünün 5 boğasından alınan ve sulandırılan split sperma ejakülatlarına 500 mcg/ml ve üstünde katılan ampicilline ve chloramphenicol'un bakteriyel flora üzerine etkili olduğu ve üremeyi önlediği saptanmıştır. Bu sonuçlar ticari formda bulunan, oldukça ucuz ve her zaman bulunabilen ampicilline ve chloramphenicol'un dondurulmuş ya da dondurulmamış boğa spermalarına, spermatozoa motilitesi niteliğini etkilemeksizin kullanılabilceğini göstermiştir. Bu konuda dikkat edilecek en önemli husus, söz konusu antibiyotiklerin bakteriyel floranın bunlara karşı zamanla direnç kazanmaması için, sulandırılmış spermanın ml'sine 500 mcg'nin altında kullanılmaması, hatta bu düzeyin, tercihen ml'de 500 mcg'nin çok daha üstünde tutulmasıdır.

Alınan bu laboratuvar çalışma sonuçlarının, ne ölçüde olumlu olursa olsun, dölverimi sonuçlarıyla ilişkilerinin saptanmasına gerek vardır. Bu bakımdan, ampicilline ve chloramphenicol katılmış ve dondurulmuş boğa spermalarının inekleri tohumlamada kullanılarak dölleme güçlerinin yani döl verimlerinin denenmesi gerekmektedir.

Literatür

- 1- Arda, M., (1978): *Genel Bakteriyoloji. A.Ü. Vet. Fak. Yay. no: 342.*
- 2- Beşe, M., (1974): *Mikrobiyolojide kullanılan biyokimyasal testler ve besi yerleri. A.Ü. Vet. Fak. Yay. No: 298. A.Ü. Basımevi, Ankara*
- 3- Brown, V.G., Schollum, L. and Jarvis, B.D.W. (1974): *Microbiology of bovine semen and artificial breeding practices under New Zeland conditions. N.Z.J. Agr. Res. 17: 431-442.*
- 4- Butzler, J.P., Dekeyser, M. and Dehaen, F. (1973): *Related Vibrio in stools. J. Pediat., 82: 493.*
- 5- Cowan, S.T., Holt, F.R., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., Ravin, A.W. and Stainer, R.Y. (1974): *Bergey's manual of Determinative Bacteriology, 8 th .Ed, Eds. R.E. Buchanan and N.F. Gibbons, Baltimore, Willians and Wilkins.*

- 6- Kuradshii, N. (1980): *Sensitivity to antibiotics, sulphonamides and furazolidon of strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from frozen bull semen.* Veterinarnomeditsinski Nanki, 17: 3-8.
- 7- Reddy, B., Krisnamurty, P.S. and Venkataswami, V. (1971): *Bacterial flora of prepuce and the effect of intrapreputal treatment on the bacteriological quality of semen.* İnd. Vet. J., 48: 722-727.
- 8- Sevinç, A., İstanbulluoğlu, E. ve Yurdaydın, N. (1983): *Sun'i Tohumlama İstasyonlarındaki boğaların sperma ve prepusyal yıkantılarının bakteriyel florası üzerinde çalışmalar.* Doğa Bilim Dergisi, cilt 7, Sayı: 2, 185-188.
- 9- Sdne, M., Ohmura, K. and Bamba, K. (1982): *Effects of various antibiotics on the control of bacteria in bour semen.* Vet. Rec., 111: 11-14.