



Ayır Prepüsyumunun Bakteriyel Mikroflorasının Araştırılması

Eser AKAL^{1*} Burcu ESİN¹ Merve Gizem SEZENER² Volkan ERGUDEN² Arzu FINDIK²

¹Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 55200, Samsun, TÜRKİYE

²Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 55200, Samsun, TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 15.08.2023

Kabul Tarihi: 29.08.2023

Basım Tarihi: 30.09.2023

Atıf yapmak için: Akal, E., Esin, B., Sezener, M.G., Erguden, V. & Fındık, A. (2023). Ayır Prepüsyumunun Bakteriyel Mikroflorasının Araştırılması. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 8(3), 398-401. <https://doi.org/10.35229/jaes.1343619>

How to cite: Akal, E., Esin, B., Sezener, M.G., Erguden, V. & Fındık, A. (2023). Investigation of the Bacterial Microflora of Stallion Preputium. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 8(3), 398-401. <https://doi.org/10.35229/jaes.1343619>

*ID: <https://orcid.org/0000-0002-6563-6486>
ID: <https://orcid.org/0000-0002-5728-1478>
ID: <https://orcid.org/0000-0003-0487-7515>
ID: <https://orcid.org/0000-0003-2215-2868>
ID: <https://orcid.org/0000-0002-9123-6160>

***Sorumlu yazarın:**

Eser AKAL
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı,
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner
Fakültesi, 55200, Samsun, Türkiye
✉: eserakal@omu.edu.tr

Öz: Aygırlarda penis ve prepüsyum, yüzeyinde yüksek bir bakteri yüküne sahiptir ve ejakülasyon sırasında spermayı kontamine eden doğal mikrobiyal floralar oluşturur. Ejaküle edilen spermanın kontaminasyonunun ana kaynağının prepüsyal kavite olduğu iyi bilinmektedir. Günümüzde, literatürde sperma alınmadan önce prepüsyumdaki mikroorganizma kontaminasyonlarını ortadan kaldırmak için standart bir metodoloji ve öneriler bulunmamaktadır. Çalışmanın amacı, aygırların prepüsyal yıkama sıvısındaki bakteri yükünü incelemek ve değerlendirmektir. Bu amaçla, prepüsyal kavite 50 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkandı ve yıkama sıvıları toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) ve toplam koliform bakteri (TKB) sayılarının belirlenmesi için kullanıldı. TMAB ve TCB tayini için 100 µl yıkama sıvısı FTS (log₁₀) ile 1:9 (wt/vol) oranında seyreltilmiştir. Bakteri yüklerinin sayımı için TMAB için Tryptic soy agar ve TCB için Mac Conkey agar kullanılmıştır. İnokülasyon ve uygun koşullarda inkübasyondan sonra bakteri yükleri kob/ml olarak hesaplanmıştır. TMAB ve TCB sayıları sırasıyla 1,1 x 10⁷ ila 9,6 x 10⁸ kob/ml ve 1,9 x 10² ila 8,1 x 10⁵ kob/ml arasında değişen sayılarda tespit edilmiştir. Bakteri yüklerinin ortalamaları TMAB için 1,82x10⁸ kob/ml ve TCB için 1,56x10⁵ kob/ml olarak belirlenmiştir. Prepüsyumdaki yüksek bakteri yükünün spermatozoa kalitesi ve fertilité üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak, bu çalışmada belirlenen bakteri yükünün aygırlarda fertilité için potansiyel risk taşıdığı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel yük, prepüsyal yıkama, aygır, TCB, TMAB.

Investigation of the Bacterial Microflora of Stallion Preputium

Abstract: The penis and prepuce of the stallion have a high bacterial load on its surface and form natural microbial floras that contaminate the semen during ejaculation. It is well known that the main source of the contaminations of the ejaculated semen is preputial cavity. Nowadays, in literature there is no standard methodology and recommendations to eliminate the microorganism contaminations from prepuce prior to semen collection. The aim of the study was to examine and evaluate the bacterial load in preputial washing fluid of stallion. For this aim, the preputial cavity were washed with 50 ml of physiological salt water (PSW) the washing fluids were used for the determination of total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) and total coliform bacteria (TCB) counts. For determination of TMAB and TCB, 100 µl of washing fluid were diluted 1:9 (wt/vol) with PSW (log₁₀). Tryptic soy agar for TMAB and Mac Conkey agar for TCB were used for the enumeration of the bacterial loads. After inoculation and incubation at appropriate conditions, bacterial loads were calculated as cfu/ml. The TMAB and TCB counts were varied between 1.80x10² to 8.0x10⁵cfu/ml and 1.0x10⁷ to 9.8x10⁸ cfu/ml, respectively. The averages of the bacterial loads were determined as 1.82x10⁸ cfu/ml for TMAB and 1.56x10⁵ cfu/ml for TCB. It's known that the high bacterial loads on preputium have negative effects on the quality of spermatozoa and fertility. In conclusion, the bacterial load determined in this study was considered to have potential risk for fertility in stallion.

***Corresponding author:**

Eser AKAL
Department of Reproduction and Artificial
Insemination, Ondokuz Mayıs University
Faculty of Veterinary Medicine, 55200, Samsun,
Türkiye
✉: eserakal@omu.edu.tr

Keywords: Bacterial load, preputial washing, stallion, TCB, TMAB.

GİRİŞ

Hastalıktan ari kaliteli sperma üretimi ve dağıtımını, tüm dünyadaki sperma istasyonlarının başlıca itici gücüdür. İstasyonlarının çoğu, kontamine sperma yoluyla patojenin yayılmasını ve her yerde bulunan bakterilerin yaygınlaşmasını önlemek için düzenli aralıklarla hastalık testi yaparak dondurulmuş sperma üretimi için minimum standart protokolü sıkı bir şekilde takip etmektedir. Suni tohumlamanın başarısı, kaliteli sperma üretimine ve tedarikine bağlıdır. Sperma kalitesini (Diemer vd., 1996) ve daha fazla doğurganlığı (Griveau vd., 1995) etkileyen önemli faktörlerden biri spermaya bulaşan bakteri yüküdür, bu nedenle spermanın kalite kontrolünde dikkate alınır (Maroto vd., 2010). Üreme mevsiminde, cinsel aktivite penis ve prepusyumun kontaminasyonuna yol açabilir (Fatnassi vd., 2014), bu da doğal çiftleşme koşullarında spermadaki mikrobiyal yükü artırabilir. Spermadaki yüksek mikrobiyal yük, aygır yönetimi, sperma toplama ve işleminin çeşitli aşamalarındaki hijyenik olmayan yönetimin bir yansımasıdır (Patel vd., 2011).

Penis ve prepusyum çok sayıda bakteriden oluşan doğal ve kalıcı bir bakteriyel floraya sahiptir (Baumber-Skaife, 2012) ve bu bakteriyel yük sperma alınmasıyla spermaya da aktarılabilir (Tischner ve Kosiniak, 1986). Mikroorganizmalar üretral fossada, peniste, prepusyumda, ejakülasyon öncesi ve sonrası üretrada ve sağlıklı aygırın spermasında tespit edilebilir (Rota vd., 2011). Bu nedenle ejakülatlarda çok sayıda nonpatojenik flora etkenleri yer alabilir (Madsen ve Christensen, 1995). Toplama işleminden sonra spermada bulunan bakteriler penis ve prepusyum mukozasından veya çevresel kontaminasyondan kaynaklanabilir (Rota vd., 2011). Ejaküle edilen spermanın kontaminasyonunun ana kaynağının prepusyal kavite olduğu iyi bilinmektedir (Aurich and Sperser, 2007). Yüzeyindeki yüksek bakteri yükü doğal bir mikrobiyal flora oluşturur ve ejakülasyon sırasında spermayı kontamine eder (Neto vd., 2015). Dış genital bölgenin mikrobiyal yükündeki dengesizlik sonucunda çeşitli Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Taylorella equalgenitalis*) ve pozitif (*Streptococcus* b-hemolitik) fırsatçı bakterilerin çoğalması söz konusu olabilir (Baumber-Skaife, 2012). Bu bakterilerin artışı tohumlanan kısıraklarda endometritise, fertilité oranlarında azalmaya ve sperma kalitesinin değişmesine neden olabilir (Pickett vd., 1987). Bu nedenle, prepusyal yıkama ile toplam bakteri yükü ortadan kaldırılabilir (Paray vd., 2018). Günümüzde, literatürde sperma toplanmadan önce prepusyumdaki mikroorganizma yükünün azaltılmasına yönelik çeşitli metotlar denenmesine standart bir metodoloji ve öneriler bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, aygırların prepusyal yıkama sıvısındaki bakteri yükünün incelenmesi ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Prepusyal Yıkama: Cinsel olgunluktaki aygırlar (n=9) travaya alınıp zapt-u rapta alındıktan sonra prepusyal kaviteyi 50 ml steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkanmıştır. Prepusyal yıkama sıvıları toplam mezofilik aerobik bakteri ve koliform bakteri sayımında kullanılmıştır.

Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri (TMAB) ve Toplam Koliform Bakteri (TCB) Tayini: TMAB ve TCB tayini için 100 µl yıkama sıvısının FTS ile 10 katlı seri dilüsyonları yapılmıştır (Anonymous, 1992). Örnekler 10¹'den 10⁻⁸'e kadar seri olarak seyreltilmiştir. 10⁻⁶, 10⁻⁷ ve 10⁻⁸'lik dilüsyonlar üçer adet Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine inoküle edilmiş ve aerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra sayılmıştır. 10⁻², 10⁻³ ve 10⁻⁴'lük dilüsyonlar üçer MacConkey agar besiyerine inoküle edilmiş ve aerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından 1-20 adet bakteri görülen besi yerlerinde koloni sayımı yapılmış ve bakteri yükleri kob/ml olarak hesaplanmıştır.

BULGULAR

Prepusyal yıkama ile 9 aygırdan elde edilen yıkantı sıvılarında TMAB ve TCB ortalama sayıları sırasıyla 1,82 x 10⁸ ve 1,56 x 10⁵ olarak bulunmuştur. Aygırların bireysel TMAB ve TCB değerleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Aygırların TMAB ve TCB Ortalama Değerleri.

Table 1. Mean TMAB and TCB Values of Stallions.

Aygır No.	TMAB sayısı (kob/ml)	TCB sayısı
1	2,4 x 10 ⁸	3,6 x 10 ⁵
2	7,2 x 10 ⁷	1,8 x 10 ³
3	2,1 x 10 ⁷	3,1 x 10 ³
4	3,1 x 10 ⁷	8 x 10 ⁴
5	7 x 10 ⁷	3,3 x 10 ⁴
6	1,1 x 10 ⁷	1,9 x 10 ²
7	9,6 x 10 ⁸	8,1 x 10 ⁵
8	1,1 x 10 ⁷	1 x 10 ⁴
9	2,3 x 10 ⁸	1,2 x 10 ⁵
Ortalama	1,82 x 10 ⁸	1,56 x 10 ⁵

TARTIŞMA VE SONUÇ

Aygır penisi ve prepusyumunun yüzeyi, ejakülatı ve dolayısıyla kısırak üreme kanalını kontamine eden çok çeşitli kommensal bakteriler tarafından kolonize edilmektedir. Penis ve prepusyumda bulunan bu mikroorganizmalar tohumlanan kısıraklarda endometritise neden olabilir (Baumber-Skaife, 2012), fertilité oranlarını düşürebilir ve sperma kalitesini etkileyebilir (Pickett vd., 1987). Ejakülattaki mikroorganizma sayısının, sperma alınmadan önce rutin olarak suyla penil yıkamaya tabi

tutulan ağırlara kıyasla penil yıkamaya hiç tabi tutulmayan ağırlarda daha yüksek olma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (Neto vd., 2015). Bakteriye kontaminasyon, spermatozoon hareketliliğinin azalması, spermatozoa kümelenmesi, değişmiş akrozom oranının artması ve pH değişiklikleri gibi bir dizi değişikliğe yol açar (Althouse vd., 2000). Ejakülata mikrobiyal florası, kriyoprezervasyon sırasında spermatozoonun ölümcül olmayan hasarının bir kısmından sorumlu olabilir (Ortega-Ferrusola vd., 2009). Çalışmamızda koloni sayımı sonucunda TMAB sayısı $1,1 \times 10^7$ ila $9,6 \times 10^8$ kob/ml ve $1,9 \times 10^2$ ila $8,1 \times 10^5$ kob/ml arasında bulunmuştur. Bu çalışmada prepüsyal yıkamadaki bakteri yüküne ilişkin bulgular, çeşitli araştırmacıların boğa (Rathnamma vd., 1997) ve deve (Ghoneima vd., 2014) elde ettiği sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Ayrıca mandalarda yapılan bir çalışmada, fizyolojik tuzlu su ve $KMnO_4$ kullanılarak prepüsyal yıkama yapılmıştır. Çalışmadaki bulgular değerlendirildiğinde kontrol grubundaki TMAB sayısı 114,28 kob/ml, fizyolojik su ile yıkama ile bu oranın 43 kob/ml'ye düştüğü, $KMnO_4$ ile yıkama sonucunda ise 26,5 kob/ml olduğu bildirilmiştir (Meena vd., 2015).

Spermanın kontamine olması makrofajlar ve polimorfonükleer granüositler tarafından reaktif oksijen türlerinin oluşmasına ve bakterileri spermatozoaya adheze olması nedeniyle hareketliliğin azalmasıyla spermadaki parametrelerin değişmesine bağlı olarak dölleme potansiyelini etkileyebilir. Ayrıca bakterilerin toksinlerinin de akrozom üzerinde doğrudan etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Morrell, 2006). Bakteriler, çoğalmaların önemli role sahip olan besin ve oksijen için spermatozoalarla rekabet eder (Rodeheaver, 1997). Prepüsyal kavitenin spermanın kontaminasyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Birçok bakterinin bu boşlukta kommensal olarak bulunması nedeniyle de sperma kontaminasyonunun önüne geçilmesi için prepüsyal yıkamanın bakteriyel yükün azaltılmasında anahtar rol oynamaktadır (Meena vd., 2015). Dış kontaminasyon spermanın kalitesini etkileyebilir ve hatta damızlık hayvanları kontamine edebilir. Patojenler ve zararlı bakterilerle kontaminasyonu sınırlamak için sıkı hijyen protokolleri uygulanmalıdır. Sperma alma sırasında prepüsyumdan veya direk spermadan kaynaklı bazı suşların, spermatozoa hareketliliğini inhibe eden spesifik bileşikler salgılaya kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Smole vd., 2010). Gentamisin, lincomycin, spectino-mycin ve tylosin gibi antibiyotikler içeren sperma sulandırıcı ilavesi ve spermanın soğutulması, her yerde bulunan ve istenmeyen bakterilerin büyümesini baskılayarak yeterli bir güvenlik garantisi olmalıdır. Ancak, özellikle patojenik potansiyele sahip bakteriler olmak üzere ağır kontaminasyon varlığında bu yeterli olmayabilir. Bazı *P. aeruginosa*, *Enterococcus* spp. ve

Clostridium spp. bu koşullarda hayatta kalabilmiş ve nihai ürünlerde hala mevcut olmuştur (Stringfellow ve Givens 2000). Sperma sulandırılması esnasında içeriğe katılan farklı antibiyotik konsantrasyonları ile sulandırma sonundaki bakteriyel yükün farklı olması da bu duruma bir örnektir. Ağırlarda yapılan bir araştırmada Botusemen ve INRA96 ile sulandırılan spermalarda nihai mikroorganizma yüklerinde önemli derecede farklılık gözlenmiştir (Neto vd., 2015).

Sonuç olarak, prepüsyumdaki yüksek bakteri yükünün spermatozoa kalitesi ve doğurganlık üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Suni tohumlama programlarında veya doğal çiftleşmede başarı elde etmek için sperma toplama ve işlemenin her aşamasında uygun hijyenik önlemler ve sıhhi önlemler gereklidir. Prepüsyal yıkama mikrobiyal yükü önemli ölçüde azaltır ve böylece sperma kalitesini artırır. Bu nedenle, bu çalışmada belirlenen bakteri yükünün ağırlarda fertilité için potansiyel risk taşıdığı düşünülmüş ve prepüsyal yıkamanın her sperma istasyonunda ve sperma işleme laboratuvarında rutin bir uygulama olması tavsiye edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Althouse, G.C., Kuster, C.E., Clark, S.G. & Weisiger, R.M. (2000).** Field investigation of bacterial contaminants and their effects on extended porcinesemen. *Theriogenology* **53**, 1167-1176. DOI: [10.1016/S0093-691X\(00\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00261-2)
- Anonymous. (1992).** A possible way to count coliform bacteria groups and *E. coli* numbers in feedstuffs and diets: A possible number(EMS). Turkish Official Newspaper, Jan 2, No.21118.
- Aurich, C. & Spargser, J. (2007).** Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, **67**(5), 912-918. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2006.11.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.004)
- Baumber-Skaife, J. (2012).** Evaluation of semen, In: McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E. & Varner, D.D. (Ed), *Equine reproduction. 2nd ed.*, 1278-1291p, Wiley-Blackwell: Chichester.
- Diemer, T., Weidner, W., Michelmann, H.W., Schiefer, H.G., Rován, E. & Mayer, F. (1996).** Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *International Journal Of Andrology*, **19**(5), 271-277. DOI: [10.1111/j.1365-2605.1996.tb00475.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00475.x)
- Fatnassi, M., Padalino, B., Monaco, D., Khorchani, T., Lacalandra, G.M. & Ham-madi, M. (2014).** Evaluation of sexual behavior of housed male camels (*Camelus dromedarius*) through female parades: Correlation with climatic parameters. *Tropical Animal Health And Production*. **46**, 313-321. DOI: [10.1007/s11250-013-0489-x](https://doi.org/10.1007/s11250-013-0489-x)

- Ghoneim, I.M., Waheed, M.M., Al-Hofofi, A.N., Fayez, M.M., Al-Eknaah, M.M., Al-Busadah, K.A. & Al-Humam, N.A. (2014).** Evaluation of the microbial quality of fresh ejaculates of camel (*Camelus dromedarius*) semen. *Animal Reproduction Science*, **149**(3-4), 218-223. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2014.07.021](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.021)
- Griveau, J.F., Domount, E., Renard, P., Challegani, J.P. & Lelannou, D. (1995).** Reactive oxygen species lipid peroxidation and enzymatic defense system in human spermatozoa. *Reproduction*, **103**, 17-26. DOI: [10.1530/jrf.0.1030017](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1030017)
- Lindeberg, H., Karjalainen, H., Koskinen, E. & Katila, T. (1999).** Quality of stallion semen obtained by a new semen collection phantom (Equidame®) versus a Missouri® artificial vagina. *Theriogenology*, **51**(6), 1157-1173. DOI: [10.1016/S0093-691X\(99\)80019-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)80019-3)
- Madsen, C.B. & Christensen, H.I. (1995).** Modelling and testing the stability of edge segments: Length and orientation. In *Theory and Applications of Image Analysis II: Selected Papers from the 9th Scandinavian Conference on Image Analysis*, 1-14.
- Maroto Martin, L.O., Munoz, E.C., De Cupere, F., Van Driessche, E., Echemenda-Blanco, D., Rodriguez, J.M. & Beeckmans, S. (2010).** Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science*. **120**(1-4), 95-104. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2010.03.008](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.03.008)
- Meena, G.S., Raina, V.S., Gupta, A.K., Mohanty, T.K., Bhakat, M., Abdullah, M. & Bishist, R. (2015).** Effect of preputial washing on bacterial load and preservability of semen in Murrah buffalo bulls. *Veterinary World*, **8**(6), 798. DOI: [10.14202/vetworld.2015.798-803](https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.798-803)
- Morrell, J.M. (2006).** Update on semen technologies for animal breeding. *Reproduction In Domestic Animals*, **41**, 63-67. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2006.00621.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00621.x)
- Neto, C.R., da Silva, Y.F.R.S., Resende, H.L., Guasti, P.N., Monteiro, G.A., Papa, P.M., José Antônio, D.J., José Nicolau, P.P.F, Alvarenga, M.A. & Papa, F.O. (2015).** Control methods and evaluation of bacterial growth on fresh and cooled stallion semen. *Journal Of Equine Veterinary Science*, **35**(4), 277-282. DOI: [10.1016/j.jevs.2015.01.014](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.01.014)
- Ortega-Ferrusola, C., González-Fernández, L., Muriel, A., Macías-García, B., Rodríguez-Martínez, H., Tapia, J.A., Alonso, J.M. & Peña, F.J. (2009).** Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? *Reproduction In Domestic Animals*, **44**, 518-522. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2008.01267.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01267.x)
- Paray, A.R., Bhakat, M., Lone, S.A., Mohanty, T.K., Sinha, R., Rahman, J.U., Khanday, Z.B. & Danish, Z. (2018).** Role of preputial washing in reducing microbial load and improving bovine semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **7**(3), 97-102. DOI: [10.4103/2305-0500.233570](https://doi.org/10.4103/2305-0500.233570)
- Patel, H.V., Patel, R.K. & Chauhan, J.B. (2011).** Biochemical properties of microbial load in frozen semen of cattle. *Wayamba Journal of Animal Science*, **3**, 117-121.
- Pickett, B.W., Squires, E.L. & McKinnon, A.O. (1987).** *Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Bulletin/Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory (USA).*
- Rathnamma, D., Rao, M.S., Ramanatha, K.R. & Raghavan, R. (1997).** Assessment of bacterial load in semen of Holstein Friesian bulls. *Current Research University of Agricultural Sciences*, **26**(11), 205-207.
- Rodeheaver, G.T. (1997).** Wound cleansing, wound irrigation, wound disinfection. In: Krasner, D., Kane, D., Wayne, P.A., ed. *Chronic Wound Care: A Clinical Source Book for Healthcare Professionals. 2nd ed.*, 97-108p, Health Management Publications Inc.
- Rota, A., Calicchio, E., Nardoni, S., Fratini, F., Ebani, V. V., Sgorbini, M., Panzani, D., Camillo, F. & Mancianti, F. (2011).** Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. *Theriogenology*, **76**(3), 464-470. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2011.02.023](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.023)
- Smole, I., Thomann, A., Frey, J. & Perreten, V. (2010).** Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant. *Reproduction In Domestic Animals*, **45**(4), 737-742. DOI: [10.1111/j.1439-0531.2008.01319.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01319.x)
- Stringfellow, D.A. & Givens, M.D. (2000).** Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. *Theriogenology*, **53**, 85-94. DOI: [10.1016/S0093-691X\(99\)00242-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00242-3)
- Tischner, M. & Kosiniak, K. (1986).** *Bacterial contamination of stallion semen collected by 'open' AV. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 90-94p.