

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE SÊMEN CAPRINO PÓS - DESCONGELAMENTO¹

Lóren Andrade Silva², Ronaldo Oliveira Silveira², André Berigo Cardoso³,
Giancarlo Magalhães dos Santos⁴, Adriano França Cunha⁴

Resumo: *O estudo microbiológico do sêmen é de fundamental importância para garantir a reprodução e a qualidade dos produtos. A contaminação pode levar a falhas reprodutivas nos reprodutores e matrizes do rebanho caprino. Este estudo permitirá identificar as bactérias contaminantes do sêmen caprino após seu descongelamento e cultivo em ágar sangue em estufa a 37°C por 48 horas, preservação em caldo BHI e glicerina, coloração de gram, e provas bioquímicas.*

Palavras-chave: *Bactérias, contaminação, reprodução.*

Introdução

De acordo com a concentração bacteriana existente em um ejaculado, os espermatozoides podem sofrer alterações morfológicas e/ou funcionais, e as fêmeas podem cursar com doenças severas no trato reprodutivo. Sendo a coleta de sêmen para inseminação artificial um procedimento não estéril, se torna constante a presença de diversos gêneros bacterianos no ejaculado (YÁNIZ et al., 2010).

Além do exame clínico, é recomendada a análise microbiológica do sêmen, permitindo assim a prevenção de doenças e melhora no índice reprodutivo, pois mesmo reprodutores que possuam bactérias patogênicas no sêmen podem ser assintomáticos (COELHO, 1976). É de fundamental importância em um rebanho caprino, para garantir ou aumentar sua capacidade reprodutiva, a realização da análise microbiológica do sêmen, visando a identificação de

¹Parte do projeto de Iniciação Científica do primeiro autor.

²Graduanda do curso de Medicina Veterinária - FACISA/UNIVIÇOSA. E-mail: lorenmedvet@gmail.com

³Médico Veterinário – Belo Horizonte, MG. E-mail: berigoandre@hotmail.com

⁴Professor do curso de Medicina Veterinária - FACISA/UNIVIÇOSA. E-mail: gianmagalhaes@hotmail.com; adrianofcunha@hotmail.com.br

microrganismos patogênicos que possam interferir na qualidade do ejaculado (SOUZA *et al.*, 2006).

O objetivo desse estudo é identificar as bactérias presentes no sêmen caprino que ainda possua viabilidade após criopreservação e descongelamento do mesmo.

Material e Métodos

O experimento teve início em março de 2013, com o preparo e manejo dos animais para coleta de sêmen pelo método de vagina artificial de modelo curto, aquecida com água a 40-42°C. Foram realizadas coletas intercaladas, com intervalo de 48 horas para cada reprodutor, sendo o sêmen coletado de quatro machos caprinos das raças Saanen (2) e Parda Alpina (2), com idade entre 1 e 3 anos. Os reprodutores utilizados pertencem ao rebanho caprino do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais.

As coletas de sêmen foram realizadas no período de 20 de maio a 03 de junho de 2013, intercaladas por 48 horas, alterando-se os bodes, um macho Saanen e um Pardo Alpino em cada dia de coleta, até se obter seis (6) ejaculados por animal, totalizando vinte e quatro (24) amostras. Estas foram acondicionados em banho-maria a 37°C, assim como os materiais utilizados, que foram mantidos em placa aquecedora de mesma temperatura para realização das análises macro e microscópicas. A determinação do volume do ejaculado, cor, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia foram realizadas observando-se o estipulado pelo CBRA (1998). Por esses padrões também foi conduzido o teste hiposmótico das amostras, com atenção à funcionalidade da membrana espermática.

Após avaliação física, coletou-se 100µL de cada amostra sem adição de qualquer diluente e estas foram acondicionadas em tubos tipo Eppendorf autoclavados e refrigeradas. Em seguida, cada amostra de sêmen foi diluída em três diferentes meios conforme descrito no Projeto de Iniciação Científica Viabilidade do Sêmen Caprino Congelado com Diluente a Base de Gema de Ovo de Codorna (*Coturnix coturnix* japônica) de Ronaldo Oliveira Silveira

(2012). E então, coletou-se outra fração de 100µL de cada amostra já diluída, que também foram acondicionadas em tubos tipo Eppendorf autoclavado, de 2mL, e refrigeradas. O volume restante de cada amostra já diluída foi envasado em palhetas de 0,25 mL na concentração de 50 milhões de spz/mL, com a identificação de cada reprodutor e tratamento utilizados, e congelado em nitrogênio líquido (-196°C).

Para análise microbiológica, as amostras de sêmen (refrigeradas e congeladas) foram acondicionadas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e secas com papel toalha. Cada amostra de 100µL foi diluída em 9,9 mL de solução salina estéril a 0,9% nas proporções 1/10, 1/100 e 1/1000 (sêmen/solução) e em seguida 100µL de cada diluição foi transferida para placa de Petri e cultivadas em ágar sangue ovino 5% e incubadas em aerobiose a 37°C por 48 horas. Após cultivo, as placas com crescimento bacteriano foram analisadas e foram feitas as anotações morfológicas das colônias formadas em cada amostra e coleta de isolamento para cultivo em solução BHI estéril por 48 horas, a 37°C em aerobiose. Este procedimento foi realizado para se permitir a preservação e avaliação das colônias posteriormente. Após o cultivo em solução BHI estéril, as colônias foram coletadas e acondicionadas em tubos tipo Eppendorf autoclavado, de 2mL, com glicerina estéril, na proporção 700µL/300µL (solução BHI + colônia/glicerina). Os tubos foram colocados em caixas de polipropileno com divisórias internas (9x9), com capacidade para 81 tubos de 1,5 a 2,2mL, próprias para criopreservação. As mesmas foram etiquetadas para identificação e congeladas a -20°C. Posteriormente se fará a coloração em técnica de Gram e as bactérias submetidas a provas bioquímicas para identificação.

Uma vez descongeladas e identificadas, deverão ser analisadas as culturas em um delineamento inteiramente casual. Todas as análises serão feitas em triplicata. Quanto à análise estatística, esta deverá ser realizada sob a análise de variância para determinar a possível significância do tratamento. Caso ocorra efeito, será aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para se comparar as médias. Uma vez coletado os dados, estes serão registrados no software excel e, logo após, analisados por meio do Sistema Para Análise Estatística, versão 9.1 (SAEG, 2007).

Resultados e Discussão

O estudo ainda não foi concluído. Até o presente momento o que se pode dizer está baseado nas análises morfológicas das colônias encontradas, sendo em sua maioria coccus e bacillus, o que corrobora os estudos realizados por Coelho (1976); Rodrigues et al. (1999); Souza et al. (2006).

Conclusões

Mesmo sem identificação das bactérias, a formação de inúmeras colônias indica que a microbiologia do sêmen é variada e estas bactérias podem levar ao desequilíbrio reprodutivo tanto em machos quanto em fêmeas.

Referências Bibliográficas

COELHO, N. M. **Flora bacteriana do prepúcio e sêmen de reprodutores Bos Taurus**. 1976. 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1976.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed., Belo Horizonte, UFMG, 1998. 49 p.

RODRIGUES, A. L. R.; BICUDO, S. D.; LOPES, C.A.M. Sensibilidade de bactérias do sêmen de touros Nelore (*Bos indicus*) em central de inseminação artificial frente a antibióticos utilizados em meios diluidores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 267-268, 1999.

SAEG **Sistema para Análises estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes – UFV – Viçosa, 2007.

S

OUZA, A. F.; GUERRA, M. M. P.; COLETO, Z. F.; MOTA, R. A.; SILVA, L. B. G.; LEÃO, A. E. D. S.; SOBRINHO, E. S. N. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 329-336, 2006.

YÁNIZ, Jesús Luis, MARCO-AGUADO, María Angeles, MATEOS, José Angel, SANTOLARIA, Pilar. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Animal Reproduction Science. Spain.* v. 122. p. 142-149, 2010. In: MION, BRUNA; MADEIRA, ELISÂNGELA M., BIANCHI, IVAN. Teste de antibiograma para verificação da eficiência de antibióticos utilizados em centrais de coleta de sêmen. XX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. **Anais...** Universidade Federal de Pelotas – RS, 2011.

