

QUALIDADE E CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DE SÊMEN SUÍNO COM O USO DE DOIS DILUENTES

Bruno Bervig Collares¹

Diciane Zeni Giehl²

Lilian Ribeiro Kratz³

Resumo:

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade espermática e caracterizar a microbiota bacteriana composta no sêmen suíno fresco e diluído, com o uso de dois diferentes diluentes, identificando as principais bactérias presentes e a sua influência na qualidade da dose inseminante final. Foram utilizados 10 ejaculados provenientes de reprodutores suínos das raças Landrace e MS115, coletados através do método de mão enluvada. As amostras foram armazenadas em temperatura de 16°C até 120 horas e as doses inseminantes foram avaliadas em três períodos. As avaliações da qualidade espermática foram referentes ao volume, motilidade, vigor e concentração. Para a análise microbiológica das amostras, as bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Ágar Padrão para Contagem (PCA) para análise macroscópica, enquanto a identificação microscópica foi realizada com a coloração de Gram e demais testes bioquímicos até a classificação das bactérias em gênero. Nos parâmetros espermáticos, os dois reprodutores se apresentaram dentro dos padrões de qualidade estabelecidos. Houve isolamento de 13 gêneros entre bactérias Gram positivas e negativas, além do isolamento de uma levedura.

Palavras-chave: Crescimento bacteriano, ejaculado, espermatozoides, laboratório, reprodução.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

QUALIDADE E CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DE SÊMEN SUÍNO COM O USO DE DOIS DILUENTES

¹ Aluno de graduação. collaresbb@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. dicianeg@yahoo.com.br. Co-autor

³ Docente. liliankratz@unipampa.edu.br. Orientador



QUALIDADE E CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DE SÊMEN SUÍNO COM O USO DE DOIS DILUENTES

1. INTRODUÇÃO

O sêmen da espécie suína possui características diferentes de outras espécies animais, por ser mais sensível ao choque ocasionado pelo frio, portanto normalmente o sêmen suíno é armazenado em refrigeração, em temperatura de 15 a 18 °C. Seu tempo de conservação é limitado, geralmente de três a cinco dias após a coleta e elaboração das doses, variando de acordo com o tipo de diluente utilizado. Porém esta faixa de temperatura e período de armazenamento não inibem o crescimento de micro-organismos capazes de afetar a qualidade da dose inseminante (BAPTISTA; BERTANI; BARBOSA, 2011).

A utilização da inseminação artificial é limitada pelos fatores de tempo de conservação do sêmen após a diluição, o qual varia de acordo com cada diluente e temperatura de armazenamento do mesmo. O uso de diluidores no sêmen suíno permite, além de aumentar o volume total da amostra, prolongar a viabilidade dos espermatozoides, fornecendo-lhes nutrientes (MAGNAGO, 2000).

A flora bacteriana encontrada no sêmen suíno é bastante diversificada, variando de acordo com o método de coleta, cuidados adotados durante a mesma e o processamento do ejaculado. Para diminuir este problema, utilizam-se antibióticos nos diluidores, porém estes muitas vezes também não são suficientes para impedir o desenvolvimento das bactérias presentes no sêmen suíno devido à alta resistência destes micro-organismos aos antibióticos utilizados.

Visando estes fatores, o presente trabalho teve o intuito de avaliar a qualidade do sêmen, através de análises macroscópicas (aspecto e volume) e microscópicas, quanto à motilidade e vigor, além da avaliação da flora bacteriana presente no sêmen suíno, quanto ao tipo de bactéria encontrado nas amostras de sêmen coletado nos diferentes períodos e com até 120 horas de armazenamento.

2. METODOLOGIA

O experimento *in vivo* foi conduzido durante vinte e oito dias entre os meses de fevereiro e março do ano de 2017, no setor de Suinocultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha (IFF), campus São Vicente do Sul/RS. A classificação bacteriana *in vitro* foi finalizada em junho do mesmo ano, no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) – campus Dom Pedrito. Os

procedimentos envolvidos neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa, com número de protocolo 003/2017.

Foram utilizados como doadores de sêmen dois reprodutores suínos, de linhagens diferentes, Landrace e MS115, com idade entre 18 e 24 meses. Os animais foram criados em sistema intensivo, dispostos em baias individuais de piso com cama sobreposta. Os reprodutores foram alimentados com ração balanceada de boa qualidade, contendo milho, farelos de soja e suplemento, com água fornecida *ad libitum*.

As coletas de sêmen dos animais foram realizadas de acordo com os métodos de higiene adequados, sempre no período da manhã e aconteceram na sala de coleta de sêmen com o uso do manequim de monta fixo, através do método de mão enluvada, contabilizando cinco coletas/animal, com frequência de duas coletas por semana, totalizando 10 amostras de ejaculado por suíno.

Para as análises da qualidade espermática foram avaliados o volume (mL) de sêmen, motilidade (%) e vigor (1-5), concentração espermática e número de espermatozoides viáveis, conforme descrito por Sobestiansky et al. (1998), para então serem produzidas as doses de sêmen (3×10^9 espermatozoides viáveis) e divididas em três grupos: Grupo 01 - sêmen fresco, Grupo 02 - sêmen diluído com o diluente Androstar® Plus (até 7 dias de armazenamento) e Grupo 03 - sêmen diluído com o diluente Suidil® (até 5 dias de armazenamento) num total de cinco amostras por diluente. Cada ejaculado foi separado em duas alíquotas, uma para a análise do sêmen e outra para a avaliação bacteriana. Cada dose foi armazenada e refrigerada em temperatura de 16°C e mantida até o último dia de cada análise.

As avaliações ocorreram nos mesmos dias das coletas, denominados, dia zero (D0) para sêmen fresco e diluído e em mais dois períodos, dia três (D3) e dia cinco (D5), apenas para o sêmen diluído, totalizando 120 horas de armazenamento após a coleta.

Para a classificação bacteriana as bactérias presentes no sêmen suíno foram semeadas em meio Ágar Padrão de Contagem (PCA), por espalhamento, através da técnica de *spread-plate* em duplicata, incubadas a 36,5°C por 48 horas para quantificação (UFC/ml), conforme descrito por Oliveira (2000). As bactérias crescidas no Ágar Padrão de Contagem foram classificadas através da análise morfológica macroscópica e microscópica, assim como pelas características tintoriais e bioquímicas que cada uma apresentava.

Para as análises de vigor, motilidade e para o crescimento bacteriano, foi realizada análise de variância em blocos com repetições de delineamento experimental de 2 blocos (os cachaços), 2 tratamentos (os diluentes) e 5 repetições (as coletas) pelo software Statistical Analysis System (SAS®). As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($P=0,05$).

Foram analisados separadamente o efeito de linhagem e diluente e também foi realizada análise fatorial e a interação entre estes fatores. Realizou-se também análise de regressão para avaliar o efeito do tempo após a coleta sobre as variáveis motilidade e vigor. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a teste de Duncan para comparação de médias em nível de significância a 5%, utilizando o procedimento PROC GLM do SAS®.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Nas avaliações microbiológicas realizadas foram isoladas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, estas últimas com uma média de frequência de 62% para o reprodutor Landrace e 66% para o MS115. Entre as positivas foram isolados cinco diferentes gêneros e oito para as Gram-negativas (Tabela 1).

Chaves (2016) relatou em seu estudo que encontrou mais de um gênero bacteriano nas doses inseminantes de sêmen suíno, sendo que o mesmo foi verificado nas amostras coletadas. As bactérias isoladas foram semelhantes para ambos os animais, porém, no cachaço MS115 também se evidenciou a presença de levedura no ejaculado.

Tabela 1: Frequência (valores absolutos e em percentagem) de micro-organismos isolados no sêmen dos reprodutores Landrace e MS115 durante as cinco coletas.

Micro-organismos		Frequência		%	
		Landrace	MS115	Landrace	MS115
Gram-positivas	<i>Staphylococcus</i> spp.	5	5	11	12
	<i>Streptococcus</i> spp.	5	3	11	7
	<i>Bacillus</i> spp.	3	2	7	5
	<i>Micrococcus</i> spp.	2	3	4	7
	<i>Corynebacterium</i> spp.	1	1	2	2
Sub-total Gram +		16	14	38	34
Gram-negativas	<i>Krebsiella</i> spp.	4	4	10	10
	<i>Proteus</i> spp.	4	3	10	7
	<i>Serratia</i> spp.	4	4	10	10
	<i>Burkholderia</i> spp.	3	3	7	7
	<i>Escherichia coli</i>	3	1	7	2

<i>Shigellaspp.</i>	2	3	5	7
<i>Providenciaspp.</i>	1	3	2	7
Levedura	-	1	-	2
<i>Sub-total Gram -</i>	26	27	62	66
Total	42	43	100	100

As amostras não apresentaram efeito significativo para a análise de regressão quanto à motilidade e vigor espermático ao longo do tempo e para os dois animais, sendo que, após o período máximo de armazenamento (D5), as amostras apresentaram resultados dentro dos padrões de qualidade estabelecidos (mínimo de 60% para motilidade e 3 para vigor), sugerindo que ambos os diluentes foram eficientes dentro dos prazos e técnicas utilizados (Tabela 2).

Tabela 2: Motilidade e Vigor espermático médios no sêmen suíno puro e com uso de diluente.

	Avaliação		Androstar® Plus						Suidil®					
Cachaço	Pré-diluição		D0		D3		D5		D0		D3		D5	
	Mot.	Vigor	Mot.	Vigor	Mot.	Vigor	Mot.	Vigor	Mot.	Vigor	Mot.	Vigor	Mot.	Vigor
Landrace	83	3,8	79	3,8	72	3,8	68	3,2	77	4,2	71	3,8	63	3,2
MS115	89	4,6	83	4,2	73	3,8	65	3,4	82	4,4	69	3,8	63	3

D0 = dia zero; D3 = dia três; D5 = dia cinco;

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais micro-organismos encontrados neste estudo foram de origem ambiental e em cargas que não prejudicaram a viabilidade das doses inseminantes (DIs), pois os valores de qualidade espermática, especialmente das características de motilidade e vigor, responsáveis pela maioria dos descartes das DIs encontraram-se dentro dos parâmetros desejáveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAPTISTA, RI. I. A. A.; BERTANI, G. R.; BARBOSA, C. N. Indicadores de bem-estar em suínos. *Ciência Rural*, v. 41, n. 10, p. 1823-1830, 2011.

CHAVES, B. População bacteriana no sêmen suíno e seus efeitos sobre a qualidade da dose inseminante. Dissertação, 62p, 2016.

MAGNAGO, L. G. P. Avaliação física e morfológica do sêmen de cães da raça pastor alemão resfriado a 5 °C. 79p. Dissertação. UFMG, Belo Horizonte, 2000.

OLIVEIRA, S. J. Guia bacteriológico prático. 1 ed. ULBRA, Canoas, RS. 2000.

SOBERTIANSKY; WENTZ, I.; SILVEIRA, P. R. S.; SESTI, L. A. C. Suinocultura Intensiva. Brasília, Embrapa, 1998. 388p.