



BRUNA RESENDE CHAVES

**POPULAÇÃO BACTERIANA NO SÊMEN SUÍNO
E SEUS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE DA
DOSE INSEMINANTE**

LAVRAS - MG

2016

BRUNA RESENDE CHAVES

**POPULAÇÃO BACTERIANA NO SÊMEN SUÍNO E SEUS EFEITOS
SOBRE A QUALIDADE DA DOSE INSEMINANTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Coorientador

Dr. Guilherme Oberlender

LAVRAS-MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Chaves, Bruna Resende.

População bacteriana no sêmen suíno e seus efeitos sobre a
qualidade da dose inseminante / Bruna Resende Chaves. – Lavras :
UFLA, 2016.

62 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador: Márcio Gilberto Zangeronimo.

Bibliografia.

1. Bactéria. 2. Espermatozoide. 3. Reprodução. 4. Sêmen. 5.
Varrão. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

BRUNA RESENDE CHAVES

**POPULAÇÃO BACTERIANA NO SÊMEN SUÍNO E SEUS EFEITOS
SOBRE A QUALIDADE DA DOSE INSEMINANTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de outubro de 2015.

Dr. Geraldo Marcio da Costa UFLA

Dr. Guilherme Oberlender IF Sul de Minas

Dr. Raimundo Vicente de Sousa UFLA

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo
Orientador

LAVRAS - MG

2015

*Aos meus amados pais Andréa e Luiz,
Às queridas irmãs Laura e Paula,
Ao meu amor Tiago,*
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e por colocar pessoas maravilhosas iluminando o meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do Mestrado em Ciências Veterinárias.

À FAPEMIG, pelo auxílio financeiro com a bolsa de estudos.

Ao CNPq pelo apoio concedido no financiamento do Projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pelo aprendizado, em especial agradeço ao meu professor e orientador Márcio Gilberto Zangeronimo, pela amizade, paciência, conselhos e pela disposição e atenção durante a orientação deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Guilherme Oberlender, Prof. Dr. Geraldo Marcio da Costa e Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa, pela disponibilidade e contribuições.

Aos integrantes do GETESE pela amizade, companheirismo e cujo apoio foi essencial para que esse trabalho se concretizasse.

Às amigas da Pós-Graduação Carla, Júlia, Juliana, Thaís, Stenia, com agradecimento especial para Bárbara que teve participação ativa e imprescindível para realização desse trabalho.

À Dircéia pela boa vontade, amizade e pelo indispensável apoio laboratorial.

À minha família pelo afeto, carinho, orações e torcida.

RESUMO GERAL

Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a influência da bacteriospermia na qualidade do sêmen suíno fresco ou armazenado a 15 °C por 72 horas. Para isso, 26 ejaculados provenientes de 26 reprodutores foram utilizados. Em seguida, os ejaculados foram diluídos em BTS sem antibiótico de forma a obter doses inseminantes contendo três bilhões de Avaliações da qualidade espermática foram realizadas após a diluição e também após 72 horas de armazenamento, assim como a avaliação microbiológica. Cada microrganismo identificado foi correlacionado com os parâmetros de qualidade do sêmen pelo teste de correlação de Spearman. No sêmen *in natura*, foram identificados de um a seis tipos de bactérias, sendo a *Staphylococcus spp.* (77% das amostras) e *Proteus mirabilis* (77%) as mais frequentes, seguida da *Burkholderia cepacia* (35%) e *Morganella morganii* (31%). No sêmen armazenado por 72 horas, foram identificados de um a cinco tipos de bactérias, sendo a *Proteus mirabilis* (96% das amostras) a mais frequente, seguido da *Morganella morganii* (31%) e *Staphylococcus spp.* (27%). Os valores de UFC/mL total obtidos com o sêmen armazenado foram numericamente superiores aos valores obtidos com o sêmen *in natura*. No sêmen fresco diluído, a *Pseudomonas putida* mostrou correlação negativa com a motilidade mas positiva com a viabilidade espermática, enquanto que a *Burkholderia cepacia* apresentou correlações positivas com a velocidade da célula espermática e integridade acrossomal, mas negativa em relação ao teor de dialdeído malônico no sêmen. No sêmen armazenado, a *Proteus mirabilis* mostrou correlações negativas com os movimentos espermáticos e positivas com o total de alterações morfológicas, viabilidade espermática e porcentagem de acrossomas íntegros. A *Pseudomonas putida* e a *Comamonas testosteroni* apresentaram correlações negativas com a motilidade espermática. A *Escherichia coli* apresentou correlações negativas com a viabilidade espermática e porcentagem de acrossomas íntegros, enquanto que a *Acinetobacter baumannii calcoaceticus* apresentou correlação positiva com o teor de dialdeído malônico e consumo de glicose pelos espermatozoides. A *Morganella morganii* apresentou correlação positiva com a viabilidade espermática. Conclui-se que dependendo da espécie de bactéria, a bacteriospermia pode influenciar a qualidade do sêmen suíno fresco ou armazenado por 72 horas a 15 °C. A *B. cepacia* e a *M. morganii* são as bactérias que melhoram a qualidade do sêmen fresco diluído e do sêmen armazenado, respectivamente. A *P. putida* é a bactéria que causa maiores injúrias no sêmen fresco, enquanto que a *P. mirabilis*, a *P. putida*, a *C. testosteroni*, a *E. coli* e a *A. baumannii* as que causam maiores prejuízos ao sêmen armazenado.

Palavras-chave: Bactéria. Espermatozoide. Reprodução. Varrão.

GENERAL ABSTRACT

This study was conducted with the objective of verifying the influence of bacteriospermia over the quality of porcine semen, fresh or stored at 15°C for 72 hours. To do this, 26 ejaculates originated from 26 reproducers were used. Subsequently, the ejaculates were diluted in BTS with no antibiotics in order to obtain inseminating doses containing three billion spermatozooids per inseminating dose. Spermatic quality evaluations were conducted after dilution and after 72 hours of storage, in addition to seminal microbiological evaluation. Each identified microorganism was correlated with the semen quality parameters by means of the Spearman correlation test. In the *in natura* semen, we identified from one to six typed of bacteria, being *Staphylococcus* spp. (77% of the samples) and *Proteus mirabilis* (77%) the most frequent, followed by *Burkholderia cepacia* (35%) and *Morganella morganii* (31%). In the semen stored for 72 hours, we identified from one to five types of bacteria, being *Proteus mirabilis* (96% of the samples) the most frequent, followed by *Morganella morganii* (31%) and *Staphylococcus* spp. (27%). The values for total CFU/mL obtained from the stored semen were numerically superior to those obtained from the *in natura* semen. In the fresh diluted semen, the *Pseudomonas putida* showed negative correlation with mobility, and positive correlation with sperm viability, while *Burkholderia cepacia* presented positive correlation with spermatic cell motility and acrosome integrity, and negative correlation in relation to the content of malonic dialdehyde in the semen. In the stored semen, *Proteus mirabilis* showed negative correlations with spermatic motility and positive correlations with total morphological changes, sperm viability and percentage of whole acrosomes. *Pseudomonas putida* and *Comamonas testosterone* presented negative correlations with spermatic motility. *Escherichia coli* presented negative correlations with sperm viability and percentage of whole acrosomes, while *Acinetobacter baumannii calcoaceticus* presented positive correlation with the content of malonic dialdehyde and glucose consumption by the spermatozoa. *Morganella morganii* presented positive correlation with sperm viability. We conclude that, depending on the species of bacteria, bacteriospermia can influence the quality of porcine semen, fresh or stored for 72 hours at 15°C. *B. cepacia* and *M. morganii* improve the quality of diluted fresh semen and of semen stored for 72 hours, respectively. *P. putida* causes higher damage to fresh semen, while *P. mirabilis*, *P. putida*, *C. testosterone*, *E. coli* and *A. baumannii* cause higher damage to stored semen.

Keywords: Bacteria. Sperm. Reproduction. Boar.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Principais microrganismos presentes no sêmen suíno	11
2.2 Efeitos dos microrganismos na qualidade espermática	13
2.3 Impactos da contaminação bacteriana do sêmen na cadeia produtiva de suínos	17
2.4 Coleta do sêmen suíno	19
2.5 Processamento e armazenamento do sêmen suíno	21
2.6 Uso de antibióticos nos diluidores seminais	22
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS	26
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	33
ARTIGO 1 Avaliação bacteriana no sêmen suíno antes e após o resfriamento e sua relação com a qualidade seminal	33
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Animais e coleta seminal	37
2.2 Procedimento experimental	38
2.3 Avaliações microscópicas do sêmen	39
2.4 Avaliações bioquímicas do sêmen	41
2.5 Avaliações microbiológicas	41
2.6 Análises estatísticas	43
3 RESULTADOS	44
3.1 Características das amostras analisadas	44
3.2 Sêmen diluído – 0 hora fresco diluído	44
3.3 Sêmen processado e armazenado	45
4 DISCUSSÃO	47
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	58

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade que vem se desenvolvendo de forma significativa nas últimas décadas em nível mundial devido ao crescimento da demanda por alimentos de origem animal. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO (2015), estima-se que, para atender a demanda global por alimentos em 2024, a produção de carnes no Brasil terá que aumentar na ordem de 24%. Esse crescimento se torna possível principalmente em função do clima favorável, disponibilidade de matéria-prima e mão-de-obra do país.

Dentro da cadeia produtiva suinícola, a reprodução se destaca como um fator chave para o desenvolvimento da atividade, uma vez que o número de leitões nascidos está diretamente relacionado ao sucesso da atividade. Diversos fatores podem afetar esse índice, tais como a eficiência reprodutiva das matrizes e a qualidade da dose inseminante utilizada. Essa última está atrelada à técnica de inseminação artificial (IA).

A IA é caracterizada pelo uso do sêmen resfriado e armazenado em temperatura de 15 a 18 °C, limitando-se a um tempo máximo de estocagem de três a cinco dias, dependendo do diluente utilizado. Nessa faixa de temperatura e tempo de armazenamento ocorre o crescimento de microrganismos que podem não só influenciar a qualidade da dose inseminante mas também predispor as fêmeas às enfermidades uterinas transmitidas via IA.

Para amenizar esses possíveis problemas, antibióticos são utilizados nos diluidores para reduzir o crescimento microbiano durante o armazenamento do sêmen. Entretanto, a preocupação com o surgimento de microrganismos resistentes potencialmente nocivos à saúde humana e dos animais vêm

estimulando a redução de sua utilização na produção animal. Além da preocupação com a resistência bacteriana, o uso indiscriminado de antibióticos ao longo da cadeia produtiva pode resultar na presença de resíduos na carne. Com isso, a utilização de antibióticos na produção animal vem sendo proibida em muitos países, sendo que essa norma tende a se difundir em nível mundial. Dessa maneira, estudos sobre o desenvolvimento de tecnologias que substituam o uso de antibióticos são importantes na reprodução.

Na produção animal, probióticos têm sido utilizados como agentes antimicrobianos para substituir os antibióticos promotores do crescimento. As bactérias ácido lácticas, por exemplo, são capazes de inibir ou reduzir a proliferação por microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos e, com isso, melhorar as condições da microbiota intestinal. Entretanto, a acidificação, que é o fator primário na preservação de produtos de fermentação láctica, pode ser nociva à integridade do espermatozoide durante o tempo em que este permanece estocado. A ideia de que possam existir bactérias benéficas ao sêmen e que a bacteriospermia possa estar relacionada à qualidade da dose inseminante tem sido pouco estudada.

Portanto, objetiva-se com esse trabalho verificar a influência da bacteriospermia na qualidade do sêmen suíno fresco ou armazenado a 15 °C por 72 horas e a relação da população microbiana seminal com a presença de bactérias prepúcio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Principais microrganismos presentes no sêmen suíno

O trato genital do suíno macho é composto pelos testículos, epidídimos e glândulas acessórias. Apresentam-se normalmente livres de contaminação, de modo que não há indícios de que a presença de bactérias no ejaculado tenha origem nesses órgãos (GALL; WILSON; ALTHOUSE, 1998). Portanto, o sêmen é um fluido estéril e tem sido demonstrado que as contaminações ocorrem durante o procedimento de coleta, processamento e armazenamento das doses inseminantes (ALTHOUSE; LU, 2005).

Por natureza, o ejaculado é considerado um meio fértil para o crescimento bacteriano devido à sua composição química, que é rica, por exemplo, em açúcares e minerais. Além disso, durante o processo de estocagem do sêmen suíno que ocorre normalmente entre 15 a 18 °C, por três a cinco dias, as condições do meio continuam sendo propícias aos microrganismos, que podem influenciar a qualidade das doses inseminantes (SANOCKA-MACIEJEWSKA; CIUPIŃSKA; KURPISZ, 2005) e, por consequência, a eficiência reprodutiva do plantel.

Inúmeras espécies de microrganismos podem ser encontradas no sêmen suíno. Pelo menos 25 gêneros bacterianos já foram isolados tanto nos ejaculados quanto nas doses inseminantes, sendo os mais frequentes *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Escherichia coli* (ALTHOUSE; LU, 2005; ARREDONDO et al., 2001; SONE et al., 1989; TAMULI; SHARMA; RAJKONWAR, 1984). A maioria desses microrganismos são bactérias gram-negativas, principalmente pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Tabela 1) (ALTHOUSE, 2008; OKAZAKI et al., 2010).

Tabela 1 Classificação por família dos gêneros bacterianos mais encontrados em ejaculados suínos

Família	Gênero
<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Alcaligenes</i> spp.
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Serratia</i> spp.
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i> spp.
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i> spp.

Fonte: Althouse (2008) e Okazaki et al. (2010).

Em um levantamento amostral de 250 ejaculados suínos, Althouse e Lu (2005) verificaram a presença de *Enterococcus* spp. (20,5%), *Stenotrophomonas maltophilia* (15,4%), *Alcaligenes xylosoxidans* (10,3%), *Serratia marcescens* (10,3%), *Acinetobacter lwoffii* (7,7%), *Escherichia coli* (6,4%) e *Pseudomonas* spp. (6,4%), além de outras espécies de bactérias (23,0%). De acordo com Bresciani et al. (2014) e Maroto Martín et al. (2010), em amostras de sêmen *in natura* de suínos, a proporção dos gêneros mais frequentemente isolados foi respectivamente 79% e 47% para *Escherichia coli*, 26,9% e 9,3% para *Proteus* spp., 26,9% e 13,9% para *Serratia* spp., 8,7% e 23,3% para *Staphylococcus* spp., 6,9% e 4,7% para *Streptococcus* spp. e 6,1% e 2,3% para *Pseudomonas* spp.

A maioria dos gêneros isolados encontrados por Schulze et al. (2015) foi associada à contaminação ambiental por bactérias oportunistas, as quais são comumente associadas a problemas de higiene. Em 88 amostras de ejaculado suíno, esses autores verificaram que, de todas as bactérias isoladas, 57% eram gram-negativas (54% *Enterobacteriaceae* e 30% *Pseudomonadaceae*) e que, das

bactérias gram-positivas, a mais frequente foi a *Leifsonia aquatica* (20%). Úbeda et al. (2013) isolaram estirpes bacterianas da família *Enterobacteriaceae* a partir de amostras de sêmen suíno. Em seu trabalho, as mais incidentes foram a *Serratia marcescens* (13%), *Klebsiella oxytoca* (12%), *Providencia stuartii* (9,1%), *Morganella morganii* (3,8%), *Proteus mirabilis* (1,9%) e *Escherichia coli* (1,5%).

2.2 Efeitos dos microrganismos na qualidade espermática

A proliferação bacteriana depende diretamente das condições do meio em que se encontram, sendo essas condições diferentes entre os gêneros bacterianos. De uma forma geral, a temperatura de armazenamento da dose inseminante suína não é a condição ideal para que esse fenômeno ocorra, porém, permite o desenvolvimento microbiano. Mesmo com o uso de antibióticos, as bactérias podem se desenvolver após a seleção de microrganismos resistentes que aumentam sua capacidade de sobrevivência (ALTHOUSE; LU, 2005). Assim, a presença de microrganismos na dose inseminante é inevitável.

As bactérias podem influenciar a funcionalidade espermática de forma direta, através da ligação a estruturas celulares, ou de forma indireta, a partir da alteração das características do meio diluidor (ALTHOUSE; LU, 2005). Estudos que descrevem a influência da contaminação bacteriana sobre os parâmetros seminais demonstram efeito deletério das características espermáticas associado à presença de bactérias no ejaculado, sendo que tais efeitos são dose dependentes, ou seja, quanto maior a contaminação, pior a qualidade seminal (ALTHOUSE et al., 2000; ALTHOUSE; KUSTER; CLARK, 1998; OBERLENDER et al., 2013).

De forma geral, dentre os efeitos provocados pela presença de bactérias nas doses inseminantes, estão o aumento dos níveis de aglutinação espermática e

alterações acrossômicas (KOHN et al., 1998) e redução da motilidade espermática e do pH seminal (MAES et al., 2008). A *E. coli*, por exemplo, tem a capacidade de se ligar aos receptores de manose dos espermatozoides causando a aglutinação (MONGA; ROBERTS, 1994). Althouse et al. (2000) descrevem que os mecanismos pelos quais outras bactérias agem nos espermatozoides são semelhantes aos da *E. coli*. Além disso, esses autores relatam que os efeitos gerados pela contaminação ocorrem mais significativamente após 36 e 48 horas de armazenamento.

Além de alterações diretas nas células espermáticas, alguns gêneros bacterianos são capazes de produzir metabólitos que inibem o crescimento de outros microrganismos (ALTHOUSE et al., 2000; BERKTAS et al., 2008; SMOLE et al., 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000) ou metabólitos que podem servir de substratos energéticos aos espermatozoides, como lactato produzido por *Lactobacillus* (WENG et al., 2014). Dessa forma, algumas bactérias poderiam gerar efeito benéfico à qualidade do sêmen, desde que realizem controle sobre o crescimento de microrganismos nocivos aos espermatozoides.

O principal mecanismo de ação das bactérias gram-negativas sobre a qualidade do sêmen ocorre a partir da liberação de lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede bacteriana liberado durante a bacteriólise (GINSBURG, 2002) e que atua como uma toxina (OSBORN, 1964).

Em camundongos, Okazaki et al. (2009) determinaram que o LPS liberado pelas bactérias gram-negativas no ejaculado diminuiu a motilidade espermática e a capacidade de fertilização *in vitro* e *in vivo*. Além disso, a presença de outras substâncias nocivas produzidas pelas bactérias, como a hemolisina e toxina *Shiga-like*, também gera importantes efeitos deletérios sobre a motilidade e viabilidade espermática (SCHULZ et al., 2010). Além das substâncias nocivas produzidas pelos microrganismos, o flagelo bacteriano e os

pili presentes nas bactérias também podem gerar patogenicidade devido às suas propriedades adesivas (VILLEGAS et al., 2005).

Bactérias gram-positivas, como *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., também produzem substâncias espermicidas. Em um estudo realizado por Qiang et al. (2007) com *Enterococcus* spp., embora nenhum efeito depressor significativo sobre a motilidade foi detectado, observou-se uma influência negativa dessa bactéria sobre a viabilidade espermática do sêmen humano, provavelmente mediada pela hemolisina.

Em relação às principais bactérias isoladas em ejaculados de suínos, a *E. coli* tem sido a mais frequente. Maroto Martín et al. (2010) isolaram a *E. coli* em 79% dos ejaculados e sugeriram que esse agente induz à forte aglutinação espermática com conseqüente redução da motilidade e redução do tamanho da leitegada. Bussalleu et al. (2011), ao analisarem o efeito de diferentes concentrações de *E. coli* na qualidade do sêmen de varrões, também observaram efeitos deletérios na qualidade, principalmente em relação à motilidade e viabilidade espermática.

Bactérias gram-positivas como *Streptococcus* sp. também afetaram a qualidade espermática, principalmente pela redução da motilidade (AUROUX; JACQUES; MATHIEU, 1991; DIEMER et al., 1996; RIDEOUT; BURNS; SIMPSON, 1982). Bennemann et al. (2000) realizaram um estudo onde foi avaliado o efeito da inoculação de *Staphylococcus aureus* em doses inseminantes de suínos, e também observaram redução da motilidade espermática. Os autores associaram esses efeitos à ação de toxinas (SONE; OHMURA; BAMBA, 1982), à redução do pH e à competição pelo mesmo substrato energético do espermatozoide (RIDEOUT; BURNS; SIMPSON, 1982), ou a danos gerados pela ação direta na membrana espermática (DIEMER et al., 1996).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* também pode acarretar danos ao espermatozoide, os quais não dependem apenas do contato direto, através das fimbrias, com os espermatozoides, mas também de um grande número de fatores extracelulares, como as proteases e fosfolipases, que afetam diretamente a matriz extracelular da membrana espermática (BEN HAJ KHALIFA et al., 2011; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Em um estudo realizado por Kaur et al. (1988) foi observado que a elastase secretada pela *P. aeruginosa* causou danos nas estruturas espermáticas e produziu efeitos espermicidas no ejaculado humano, de rato e de touro. Esses resultados são consistentes com aqueles observados por Sepúlveda et al. (2014) que avaliaram os efeitos de diferentes concentrações de *P. aeruginosa* e observaram efeitos espermicidas devido à redução da motilidade, viabilidade e integridade do acrossoma no espermatozoide suíno.

Outro mecanismo de patogenicidade das bactérias é a alteração das características do meio, tais como alteração de pH devido à produção de ácidos como metabólitos bacterianos (GOLDEBERG, 2008; PURDY et al., 2010). Essa acidificação do meio foi descrita anteriormente para as bactérias *E. cloacae* e *E. coli* (PRIETO-MARTINEZ et al., 2014; RIDEOUT; BURNS; SIMPSON, 2001). Prieto-Martínez et al. (2014), ao avaliarem a contaminação por *E. cloacae* em ejaculados suínos, observaram danos causados pela presença dessa bactéria nos espermatozoides, com o comprometimento da longevidade espermática e da capacidade de fertilização das doses inseminantes.

Devido à elevada diversidade de bactérias que podem estar presentes no ejaculado suíno, alguns gêneros bacterianos podem agir de maneira benéfica, auxiliando no controle de agentes patogênicos. Bactérias do gênero *Lactobacillus* têm sido citadas como potenciais agentes probióticos, já que as bactérias lácticas são capazes de inibir ou reduzir a contaminação por microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos por meio da produção de agentes

antimicrobianos (CHANG et al., 2001). Barbonetti et al. (2011) verificaram efeito positivo da presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* (*L. brevis* - CD2, *L. salivarius* - FV2 - e *L. plantarum* - FV9) na qualidade do sêmen humano, já que tais bactérias reduziram a taxa peroxidativa de lipídeos nos espermatozoides e, conseqüentemente, mantiveram a motilidade e a viabilidade do sêmen por mais tempo. Entretanto, o real mecanismo dessa redução peroxidativa ainda é desconhecido.

Portanto, compreender o verdadeiro papel da microbiota existente no ejaculado dos animais pode ser fundamental na manutenção da qualidade espermática durante o tempo de armazenamento da dose inseminante resfriada.

2.3 Impactos da contaminação bacteriana do sêmen na cadeia produtiva de suínos

Os microrganismos são considerados contaminantes seminais importantes, uma vez que podem causar prejuízos econômicos na produção de suínos (PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2014), devido tanto à redução da qualidade seminal quanto ao aumento da disseminação de patógenos via dose inseminante. Dessa forma, a contaminação microbiológica é um importante parâmetro a ser considerado no controle de qualidade do sêmen tanto para inseminação artificial (IA) quanto para sistemas de monta natural (MAROTO MARTÍN et al., 2010).

A IA maximiza a utilização dos machos, já que um mesmo reprodutor fornece sêmen para um número maior de fêmeas. O uso desta biotecnologia pode ser uma ferramenta de biossegurança importante, contribuindo para manter os sistemas de produção de suínos sanitariamente fechados, mas geneticamente abertos, reduzindo o risco de introdução de doenças em plantéis (BOUMA, 2000; THACKER et al., 1984). No entanto, com o uso da IA, há possibilidade de veiculação de agentes patogênicos por meio de um ejaculado

para um número maior de fêmeas (SOBESTIANSKY; MATOS, 2000), comprometendo, assim, a fertilidade e a prolificidade de um rebanho.

A eficiência da IA como ferramenta de biossegurança depende da atenção dada à sanidade dos reprodutores, à localização da Central de IA, à higiene durante o processamento do sêmen e à logística de distribuição das doses aos produtores (RUVALCABA et al., 2000). Para isso, é de fundamental importância o conhecimento dos elos da cadeia epidemiológica na transmissão de doenças pela IA, a fim de que sejam elaboradas e implantadas medidas sanitárias efetivas e tecnicamente justificadas para assegurar a qualidade das doses de sêmen produzidas (GUÉRIN; POZZI, 2005).

Apesar de a veiculação de patógenos via dose inseminante ser um fator que pode comprometer a sanidade do plantel, as bactérias provocam, geralmente, poucos problemas reprodutivos após a inseminação quando estão presentes em pequenas quantidades (10 bactérias/mL de sêmen diluído), embora constituam um fator de risco em relação à fertilidade da fêmea (PERESTRELO-VIEIRA; PERESTRELO-VIEIRA, 1995). Isso ocorre principalmente devido aos mecanismos de defesa não específicos do útero que são muito eficientes durante a fase de estro, especialmente aqueles baseados na ação de polimorfonucleares que atuam eliminando o excesso de sêmen e os corpos estranhos, incluindo vírus e bactérias.

Entretanto, a utilização de ejaculados com elevada contaminação por bactérias (acima de 10 UFC/mL de sêmen diluído) e, principalmente por vírus, impõe risco de infecção genital da fêmea inseminada, podendo causar, em determinadas situações, descargas vulvares multifatoriais, metrites, retornos regulares ou irregulares ao estro, abortamentos, aumento do número de natimortos e fetos mumificados, redução do tamanho da leitegada e nascimento de leitões fracos (BOUMA, 2000; SOBESTIANSKY; MATOS, 2000). Outra importante consequência da contaminação do sêmen é a redução da vida útil das

doses. Na rotina, a perda precoce e significativa da motilidade no sêmen diluído é atribuída a outras causas, como problemas com o reprodutor, choque térmico e qualidade do diluente, sendo esporádica a investigação bacteriológica para a solução de problemas de conservação de sêmen diluído (ALTHOUSE; LU, 2005).

Dessa maneira, controlar os principais pontos críticos de contaminação do ejaculado é de fundamental importância para manter a sanidade e eficiência reprodutiva do plantel.

2.4 Coleta do sêmen suíno

O método de coleta seminal mais empregado na suinocultura é o de fixação do pênis com a mão enluvada, desenvolvida por Hancock e Howell (1959). Durante esse processo é difícil evitar a contaminação bacteriana tanto de origem ambiente, quanto a partir do prepúcio (AKHTER et al., 2008; ALTHOUSE et al., 2000; AURICH; SPERGSER, 2007), sendo que a presença desses microrganismos no ejaculado pode ser considerada um componente normal (ALTHOUSE; LU, 2005). Dessa maneira, a coleta é considerada um procedimento não estéril, pois, embora a produção espermática ocorra no testículo e fique armazenada no epidídimo, estruturas estéreis, a contaminação pode ocorrer quando o ejaculado entra em contato com diferentes ambientes que contenham bactéria, como a uretra distal e o prepúcio (BONET; GARCIA-BONAVILA; SEPÚLVEDA, 2013).

Embora a contaminação seja inevitável, a carga contaminante pode ser reduzida através de medidas de higiene aplicadas à luva de coleta e à região peniana, além de evitar que, fluido prepucial escorra no recipiente de coleta (WABERSKI; PETRUNKINA; TÖPFER-PETERSEN, 2010). Tais pontos de contaminação estão relacionados ao maior número de mesófilos aeróbios

(ALTHOUSE et al., 2000). Além desses pontos, cuidados durante o processamento do ejaculado também são importantes para evitar a contaminação seminal.

Ness et al. (2007) afirmam que a água utilizada tanto para lavar os materiais não descartáveis quanto para preparar o diluente é a principal fonte de contaminação bacteriana para o ejaculado. Dessa forma deve-se sempre realizar uma correta manutenção dos filtros de água, assim como estar atento à lavagem dos materiais. Portanto, para reduzir a contaminação do ejaculado, a disseminação de patógenos e a queda da qualidade da dose inseminante, os protocolos de IA exigem altos padrões de controle sanitário durante coleta do ejaculado, processamento e armazenamento do sêmen (BUSSALLEU; TORNER, 2013).

As fontes de contaminação do ejaculado podem ser classificadas como de origem animal ou não animal (ALTHOUSE; PIERDON; LU, 2008). As fontes de origem animal são aquelas oriundas dos fluidos prepuciais, secreções respiratórias, pele e pelo (MAROTO MARTÍN et al., 2010). Além dessas fontes, a uretra é parte comum do sistema urinário e genital de suínos. Dessa forma, a contaminação do sêmen pode ter origem em ambos os sistemas (JOHNSON, 1991).

Com relação às fontes de contaminação de origem não animal, as principais são aquelas provenientes da equipe que coleta (roupas, sapatos, luvas, pele, cabelo e secreções respiratórias), da água utilizada nos diluidores, das más condições de higiene do ambiente e de outros equipamentos que venham a entrar em contato com o ejaculado (ALTHOUSE; LU, 2005). A qualidade e as características da água são importantes não só em relação à contaminação, mas também para a manutenção da sobrevivência espermática e, conseqüentemente, para a fertilidade. A purificação pode ocorrer por meio de processos que envolvam destilação, deionização, filtração e iluminação de UV, sendo que a sua

pureza pode ser testada pelo pH, condutividade, osmolaridade e bacteriologia (FEITSMA, 2009).

A maior parte das estirpes bacterianas que são encontradas nos ejaculados não são consideradas patógenos primários em suínos (ALTHOUSE; LU, 2005). Porém, o grau de contaminação com determinadas estirpes da Família *Enterobacteriaceae* pode ser um parâmetro importante como indicador de qualidade do sêmen que é usado para IA, uma vez que o resultado final de tal contaminação pode causar a redução do desempenho reprodutivo do rebanho (ALTHOUSE et al., 2000).

2.5 Processamento e armazenamento do sêmen suíno

Com relação ao processamento da dose inseminante, diversos tipos de diluidores podem ser utilizados, sendo classificados como de curta (até 72 horas), média (até 96–120 horas), longa duração (até 168 horas) ou de ultra longa duração (até 360 horas), de acordo com o tempo de armazenamento no qual a dose seminal mantém sua qualidade (ROCA et al., 2006). A função do diluidor é fornecer os nutrientes necessários para a manutenção metabólica das células espermáticas, para o controle do pH, da pressão osmótica do meio e para inibir crescimento microbiano (GADEA, 2003).

Para minimizar os efeitos da carga bacteriana na dose inseminante, agentes antimicrobianos são normalmente incluídos na formulação dos diluidores (ALTHOUSE et al., 2000; YÁÑIZ et al., 2010). No entanto, a eliminação completa não pode ser assegurada, porque muitas bactérias são resistentes a essas substâncias que são comumente utilizadas em diluidores (BOLARÍN GUILLÉN, 2011; MAES et al., 2008).

Além da composição do diluente, a temperatura de armazenamento das doses inseminantes também favorece a proliferação bacteriana (GOLDBERG et

al., 2008), já que a temperatura de 15 a 17 °C não é capaz de inibir o metabolismo desses microrganismos. As bactérias geralmente são resistentes às alterações ambientais, possuindo capacidade de se adaptar a amplas variações. Essa adaptabilidade é atribuída à presença de organelas intracelulares que auxiliam na modificação da fluidez de membrana, favorecendo sua adaptabilidade térmica. Dessa forma, a temperatura ideal de armazenamento do sêmen suíno não interrompe a atividade microbiana (ALTHOUSE; LU, 2005) sendo que, com o passar do tempo de estocagem, a contagem bacteriana seminal pode elevar.

2.6 Uso de antibióticos nos diluidores seminais

Como descrito anteriormente, os diluidores foram desenvolvidos especificamente para nutrir e prolongar a viabilidade das células espermáticas, mas esses mesmos atributos os tornam um meio potencial para o crescimento bacteriano (MAROTO MARTIN et al., 2010). Para controlar esse crescimento, agentes antimicrobianos são componentes essenciais dos diluidores (SPECK et al., 2014).

A redução da motilidade e os danos ao acrossoma da célula espermática de mamíferos, entre outros efeitos, podem ser observados em decorrência do crescimento bacteriano na dose inseminante (ZAGORSKI; PAVLOV; TSOICHEVA, 1972). Por esse motivo, o uso de antibióticos nos meios diluidores tem sido uma prática recorrente, possibilitando o aumento do tempo de estocagem do ejaculado (POOLPERM; FLOWERS; ALMOND, 1998), principalmente de suínos, equinos, bovinos e do homem.

Tradicionalmente, a penicilina e a estreptomicina foram uma combinação antimicrobiana adicionada aos diluidores durante muitos anos (SONE et al., 1989). Atualmente, a classe mais popular de antibióticos usada em

diluidores de sêmen suíno é a dos aminoglicosídeos, especialmente a gentamicina (ALTHOUSE et al., 2005). Entretanto, Corrêa et al. (2001) citam que as bactérias isoladas com maior frequência nos ejaculados, a *E. coli* e a *Pseudomonas* ssp. apresentaram-se resistentes a esses antibióticos. De fato, embora esses antimicrobianos sejam adicionados em concentrações elevadas, outros estudos revelaram elevação da bacteriospermia no sêmen suíno armazenado por tempos prolongados na presença de gentamicina (ALTHOUSE et al., 2005; UBEDA et al., 2013). Além disso, segundo Bolarín Guillén (2011), estudos demonstraram que mais de 90% das bactérias isoladas a partir da dose inseminante são resistentes à maioria dos antibióticos utilizados no processamento seminal.

A resistência bacteriana tem sido associada à utilização de concentrações sub inibitórias de antibióticos que ocorrem após a diluição do sêmen (DAVIES; SPIEGELMAN; YIM, 2006). Essas sub concentrações proporcionam a seleção de bactérias resistentes e facilitam a transferência horizontal de genes de resistência (KIM et al., 2014). Portanto, é importante padronizar procedimentos de operação a fim de reduzir o risco do desenvolvimento e disseminação de bactérias resistentes nas granjas suinícolas (SCHULZE et al., 2015).

Devido a essas condições e à preocupação com o surgimento de microrganismos resistentes potencialmente nocivos à saúde humana e dos animais, o uso na produção animal de antimicrobianos vem sendo reduzido. Além da preocupação com a resistência bacteriana, o uso indiscriminado de antibióticos ao longo da cadeia produtiva pode resultar na presença de resíduos na carne (VONDRUSKOVA, 2010). Dessa forma, há a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias e processos que reduzam a proliferação bacteriana no sêmen e minimizem a utilização de antibióticos.

Nesses casos, o uso de probióticos como controladores do crescimento e colonização de bactérias patogênicas já vem sendo amplamente empregado na área de nutrição (SAZAWAL et al., 2006; TONG et al., 2007). Da mesma maneira, na indústria alimentícia, há muitos anos, vem sendo empregado o uso de microbiota protetora e/ou seus peptídeos antimicrobianos, as chamadas bacteriocinas, com a finalidade de aumentar a vida útil e garantir a segurança dos alimentos por meio da técnica de biopreservação. Dessa maneira, o estudo de possíveis agentes microbianos benéficos para o sêmen pode ser uma alternativa ao uso de antibióticos.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação bacteriana do sêmen suíno é um processo normal, sendo quase impossível a obtenção de ejaculados estéreis. As bactérias não são componentes normais do sêmen, sendo que a sua presença acarreta alterações tanto espermáticas como, por exemplo, a redução da motilidade quanto ambientais, através da redução do pH do meio e da disponibilidade de substratos. Tais alterações acarretam na produção de doses inseminantes de qualidade inferior, o que gera prejuízos econômicos na produção de suínos, através da redução dos índices reprodutivos. Dessa forma, a compreensão do verdadeiro papel e dos mecanismos pelos quais a microbiota seminal afeta a qualidade do sêmen é de fundamental importância para produzir doses inseminantes suínas de melhor qualidade.

REFERÊNCIAS

- AKHTER, S. et al. Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, n. 3, p. 272-278, June 2008.
- ALTHOUSE, G. C. Sanitary procedures for the production of extended semen. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v. 43, n. 2, p. 374-378, July 2008.
- ALTHOUSE, G. C. et al. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, New York, v. 53, n. 5, p. 1167-1176, Mar. 2000.
- ALTHOUSE, G. C.; KUSTER, C. E.; CLARK, S. G. Contaminant growth of spermicidal bacteria in extended porcine semen. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. **Abstract...** Birmingham, 1998. v. 2, p. 37.
- ALTHOUSE, G. C.; LU, K. G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 2, p. 573-584, Jan. 2005.
- ALTHOUSE, G. C.; PIERDON, M. S.; LU, K. G. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 8, p. 1317-1323, Nov. 2008.
- ARREDONDO, C. et al. Bacteriological studies of swine semen. Preliminary evaluation of the effect of *Escherichia coli* lectins on sperm agglutination. **Revista Cubana Salud Animal**, Habana, v. 23, n. 2, p. 73-79, 2001.
- AURICH, C.; SPERGSEER, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 67, n. 5, p. 912-918, Mar. 2007.
- AUROUX, M. R.; JACQUES, L.; MATHIEU, D. Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in-vitro study in man with *Escherichia coli*. **International Journal of Andrology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 264-270, Aug. 1991.
- BARBONETTI, A. et al. Effect of vaginal probiotic *Lactobacilli* on in vitro-induced sperm lipid peroxidation and its impact on sperm motility and viability. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, n. 8, p. 2485-2488, June 2011.

BEN HAJ KHALIFA, A. et al. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Annales de Biologie Clinique, Paris*, v. 69, n. 4, p. 393-403, 2011.

BENNEMANN, P. E. et al. Motilidade espermática e integridade acrossomal em doses de sêmen suíno refrigeradas e inoculadas com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 313-318, abr. 2000.

BERKTAS, M. et al. Sperm motility changes after coincubation with various uropathogenic microorganisms: an in vitro experimental study. **International Urology and Nephrology**, Amesterdam, v. 40, n. 2, p. 383-389, 2008.

BOLARÍN GUILLÉN, A. Bacteriología en semen de porcino. **Avances en Tecnología Porcina**, Madrid, v. 8, n. 79, p. 20-30, maio 2011.

BONET, S.; GARCIA-BONAVILA, E.; SEPÚLVEDA, L. The Boar reproductive system. In: BONET, S. et al. (Ed.). **Boar reproduction**. Berlin: Springer-Verlag, 2013. p. 65-109.

BOUMA, A. Transmissible virus diseases in porcine reproduction. **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v. 35, n. 6, p. 243-246, Dec. 2000.

BRESCIANI, C. et al. Boar semen bacterial contamination in Italy and antibiotic efficacy in a modified extender. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 13, n. 1, p. 83-87, Jan. 2014.

BUSSALLEU, E. et al. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 127, n. 3/4, p. 176-182, Sept. 2011.

BUSSALLEU, E.; TORNER, E. Quality improvement of boar seminal doses. In: BONET, S. et al. (Ed.). **Boar reproduction**. Berlin: Springer Verlag, 2013. p. 517-551.

CHANG, Y. H. et al. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 80, n. 2, p. 193-199, Oct. 2001.

CORRÊA, M. N. et al. (Ed.). **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printpar, 2001. 181 p.

DAVIES, J.; SPIEGELMAN, G. B.; YIM, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 445-453, Oct. 2006.

DIEMER, T. et al. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. **International Journal of Andrology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 271-277, Oct. 1996.

FEITSMA, H. Artificial insemination in pigs, research and developments in The Netherlands, a review. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p. 61-71, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **World food situation**. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

GADEA, J. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 1, n. 2, p. 17-27, 2003.

GALL T. J.; WILSON, M. E.; ALTHOUSE, G. C. Quantification of bacteria in fractionated boar ejaculates. In: SWINE CONFERENCE, 5., 1998, Minnesota. **Abstract...** Minneapolis: The Conference, 1998. p. 45.

GINSBURG, I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, n. 3, p. 171-179, Mar. 2002.

GOLDENBERG, A. M. Fatores relacionados à contaminação bacteriana das doses inseminantes e suas consequências. **Suinocultura em Foco**, Porto Alegre, n. 25, p. 8-9, set. 2008.

GUÉRIN, B.; POZZI, N. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 2, p. 556-572, Jan. 2005.

HANCOCK, J. L.; HOWELL, G. J. R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, London, v. 71, n. 5, p. 664-665, 1959.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. **Clinical Microbiology**, Washington, v. 4, n. 1, p. 80-128, Jan. 1991.

KAUR, M. et al. Bacteriology of the cervix in cases of infertility: effect on human and animal spermatozoa and role of elastase. **American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology**, New York, v. 17, n. 1, p. 14-17, 1988.

KIM, S. et al. Transfer of antibiotic resistance plasmids in pure and activated sludge cultures in the presence of environmentally representative microcontaminant concentrations. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 468/469, p. 813-820, Jan. 2014.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v. 36, n. 2, p. 78-91, Feb. 2006.

KOHN, F. M. et al. Influence of urogenital infections on sperm functions. **Andrologia**, Berlin, v. 30, n. 1, p. 73-80, 1998.

MAES, D. et al. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 8, p. 1337-1345, Nov. 2008.

MAROTO MARTÍN, L. O. et al. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 120, n. 1/4, p. 95-104, July 2010.

MONGA, M.; ROBERTS, J. A. Sperm agglutination by bacteria: receptor-specific interactions. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 151-156, Apr. 1994.

NESS, A. et al. Identification of water system biofilm bacteria and the negative effects on reproductive traits. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS, 2007, Davis. **Proceedings...** Davis, 2007. p. 47.

OBERLENDER, G. et al. Bacteriologia do sêmen suíno: aspectos relacionados: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 11, n. 20, p. 1-15, jan. 2013.

OKAZAKI, Y. et al. Expression of the Toll-like receptor system that recognize bacterial infection, controls fertilization ability in mammalian spermatozoa. **Reproductive Immunology Biology**, Oxford, v. 24, p. 174, 2009. Abstract.

OKAZAKI, T. et al. Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. **Theriogenology**, New York, v. 74, n. 9, p. 1691-1700, Dec. 2010.

OSBORN, M. J. Lipopolysaccharide of the gram-negative cell wall. **Science**, New York, v. 145, n. 3634, p. 783-789, Aug. 1964.

PERESTRELO-VIEIRA, R.; PERESTRELO-VIEIRA, H. Algumas notas sobre as doenças transmitidas pelo sêmen de suíno. **Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 43, p. 5-14, 1995.

POOLPERM, P.; FLOWERS, W. L.; ALMOND, G. W. Evaluation of antibiotics in boar semen extender. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 1998, Birmingham. **Proceedings...** Birmingham, 1998. 1 CD-ROM.

PRIETO-MARTÍNEZ, N. et al. Effects of *Enterobacter cloacae* on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 148, n. 1/2, p. 72-82, July 2014.

PURDY, P. H. et al. The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 2/4, p. 231-235, June 2010.

QIANG, H. et al. Influence of enterococci on human sperm membrane in vitro. **Asian Journal of Andrology**, Beijing, v. 9, n. 1, p. 77-81, Jan. 2007.

RIDEOUT, M. I.; BURNS, S. J.; SIMPSON, R. B. Influence of bacterial products on the motility of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 32, p. 35-40, 1982.

ROCA, J. et al. Challenges in pig artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, n. 2, p. 43-53, Oct. 2006.

RUVALCABA, J. A. G. et al. Inseminación artificial: bioseguridad de los centros de IA. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DE SUÍNOS, 7., 2000, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2000. p. 298-309.

SANOCKA-MACIEJEWSKA, D.; CIUŃSKA, M.; KURPISZ, M. Bacterial infection and semen quality. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 67, n. 1/2, p. 51-56, Oct. 2005.

SAZAWAL, S. et al. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 6, n. 6, p. 374-382, June 2006.

SCHULZ, M. et al. Effect of *Escherichia coli* and its soluble factors on mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine translocation, viability, and motility of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, New York, v. 94, n. 2, p. 619-623, July 2010.

SCHULZE, M. et al. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. **Theriogenology**, New York, v. 83, n. 3, p. 430-437, Feb. 2015.

SEPÚLVEDA, L. et al. Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 150, n. 3/4, p. 96-106, Nov. 2014.

SMOLE, I. et al. Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v. 45, n. 4, p. 737-742, Aug. 2010.

SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M. P. C. Doenças transmissíveis via sêmen. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DE SUÍNOS, 7., 2000, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2000. p. 295-297.

SONE, M. et al. Effects of bacteria-contaminated boar semen on the reproductive performance. **Japan Journal of Animal Reproduction**, Tokyo, v. 35, n. 3, p. 159-164, 1989.

SONE, M.; OHMURA, K.; BAMBIA, K. Effects of various antibiotics on the control of bacterial in boar semen. **The Veterinary Record**, London, v. 111, n. 1, p. 11-14, July 1982.

SPECK, S. et al. Cationic synthetic peptides: assessment of their antimicrobial potency in liquid preserved boar semen. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 8, p. e105949, Aug. 2014.

TAMULI, M. K.; SHARMA, D. K.; RAJKONWAR, C. K. Studies on the microbial flora of boar semen. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 61, p. 858-861, 1984.

THACKER, B. J. et al. The diseases transmissible with artificial insemination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 185, n. 5, p. 511-516, Sept. 1984.

TONG, J. L. et al. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 155-168, Jan. 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia ambiental. In: _____. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. cap. 27.

ÚBEDA, J. L. et al. Adverse effects of members of the *Enterobacteriaceae* family on boar sperm quality. **Theriogenology**, New York, v. 80, n. 6, p. 565-570, Oct. 2013.

VILLEGAS, J. et al. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. **Apoptosis**, London, v. 10, n. 1, p. 105-110, Jan. 2005.

VONDRUSKOVA, H. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhea in weaned piglets: a review. **Veterinarni Medicina**, Praha, v. 55, p. 199-224, May 2010.

WABERSKI, D.; PETRUNKINA, A. M.; TÖPFER-PETERSEN, E. Can external quality improve pig AI efficiency? **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 8, p. 1346-1351, Nov. 2008.

WENG, S. L. et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. e110152, Oct. 2014.

YÁNIZ, J. et al. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 1/2, p. 142-149, Oct. 2010.

ZAGORSKI, D.; PAVLOV, A.; TSOICHEVA, P. Damage to sperm cells caused by bacteria. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1972, Munchen. **Astract...** Munchen, 1972. p. 313.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1 Avaliação bacteriana no sêmen suíno antes e após o resfriamento e sua relação com a qualidade seminal

Bruna Resende Chaves¹

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme exigido pela UFLA.

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Lavras-MG, 37.200-000. E-mail: brunarufla@gmail.com.

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a influência da bacteriospermia na qualidade do sêmen suíno fresco ou armazenado a 15 °C por 72 horas. Para isso, 26 ejaculados provenientes de 26 reprodutores foram utilizados. Em seguida, os ejaculados foram diluídos em BTS sem antibiótico de forma a obter doses inseminantes contendo três bilhões de Avaliações da qualidade espermática foram realizadas após a diluição e também após 72 horas de armazenamento, assim como a avaliação microbiológica. Cada microrganismo identificado foi correlacionado com os parâmetros de qualidade do sêmen pelo teste de correlação de Spearman. No sêmen *in natura*, foram identificados de um a seis tipos de bactérias, sendo a *Staphylococcus spp.* (77% das amostras) e *Proteus mirabilis* (77%) as mais frequentes, seguida da *Burkholderia cepacia* (35%) e *Morganella morganii* (31%). No sêmen armazenado por 72 horas, foram identificados de um a cinco tipos de bactérias, sendo a *Proteus mirabilis* (96% das amostras) a mais frequente, seguido da *Morganella morganii* (31%) e *Staphylococcus spp.* (27%). Os valores de UFC/mL total obtidos com o sêmen armazenado foram numericamente superiores aos valores obtidos com o sêmen *in natura*. No sêmen fresco diluído, a *Pseudomonas putida* mostrou correlação negativa com a motilidade mas positiva com a viabilidade espermática, enquanto que a *Burkholderia cepacia* apresentou correlações positivas com a velocidade da célula espermática e integridade acrossomal, mas negativa em relação ao teor de dialdeído malônico no sêmen. No sêmen armazenado, a *Proteus mirabilis* mostrou correlações negativas com os movimentos espermáticos e positivas com o total de alterações morfológicas, viabilidade espermática e porcentagem de acrossomas íntegros. A *Pseudomonas putida* e a *Comamonas testosteroni* apresentaram correlações negativas com a motilidade espermática. A *Escherichia coli* apresentou correlações negativas com a viabilidade espermática e porcentagem de acrossomas íntegros, enquanto que a *Acinetobacter baumannii calcoaceticus* apresentou correlação positiva com o teor de dialdeído malônico e consumo de glicose pelos espermatozoides. A *Morganella morganii* apresentou correlação positiva com a viabilidade espermática. Conclui-se que dependendo da espécie de bactéria, a bacteriospermia pode influenciar a qualidade do sêmen suíno fresco ou armazenado por 72 horas a 15 °C. A *B. cepacia* e a *M. morganii* são as bactérias que melhoram a qualidade do sêmen fresco diluído e do sêmen armazenado, respectivamente. A *P. putida* é a bactéria que causa maiores injúrias no sêmen fresco, enquanto que a *P. mirabilis*, a *P. putida*, a *C. testosteroni*, a *E. coli* e a *A. baumannii* as que causam maiores prejuízos ao sêmen armazenado.

Palavras-chave: Bactéria. Espermatozoide. Reprodução. Varrão.

1 INTRODUÇÃO

A técnica de inseminação artificial (IA) tem sido amplamente utilizada na suinocultura, garantindo bons índices de fertilidade com menor número de machos no plantel (KNOX, 2016). No entanto, a presença de bactérias no sêmen suíno é comum, já que a coleta do ejaculado e o processamento das doses inseminantes não ocorrem em condições estéreis (ALTHOUSE; LU, 2005). Além disso, as condições de armazenamento do sêmen favorecem a proliferação bacteriana, já que a temperatura normalmente permanece em torno de 15 a 18 °C (LÓPEZ RODRÍGUEZ et al., 2012).

Mais de 25 gêneros bacterianos já foram isolados tanto nos ejaculados *in natura* quanto nas doses inseminantes de suínos. A maioria dos contaminantes são bactérias gram-negativas, principalmente da família *Enterobacteriaceae* (ALTHOUSE, 2008; OKAZAKI et al., 2010). As bactérias mais frequentemente isoladas no sêmen suíno são *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* e *Pseudomonas sp* (BRESCIANI et al., 2014; MAROTO MARTÍN et al., 2010), sendo que a maioria pode afetar a qualidade das doses inseminantes, resultando em menores taxas de fertilidade do rebanho (MAROTO MARTIN et al., 2010).

No entanto, um estudo recente mostrou, em humanos, que bactérias do gênero *Lactobacillus* (*L. brevis* - CD2, *L. salivarius* - FV2 - e *L. plantarum* - FV9) apresentam efeitos positivos na qualidade seminal por reduzir a taxa peroxidativa de lipídeos nos espermatozoides e,

consequentemente, manter a motilidade e a viabilidade do sêmen por mais tempo (BARBONETTI et al., 2011). De fato, tais bactérias são capazes de inibir ou reduzir a contaminação por microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos no trato gastrointestinal de leitões (CHANG et al., 2001). Em mulheres, Falagas et al. (2007) afirmaram que o ambiente vaginal apresenta um ecossistema balanceado no qual os lactobacilos são predominantes e que tais microrganismos são capazes de antagonizar inúmeros patógenos no trato geniturinário por diferentes mecanismos.

A perspectiva que tais resultados também possam ser obtidos com animais tem sido pouco estudada. Além disso, o aproveitamento dos benefícios que certas bactérias poderiam ter sobre a qualidade das doses inseminantes poderia ajudar a reduzir o uso de antibióticos nos diluentes seminais. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho identificar as principais bactérias presentes no ejaculado suíno e nas doses inseminantes e correlacionar a presença destas com parâmetros de qualidade do sêmen.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e coleta seminal

Todos os procedimentos envolvidos nesse trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras, com número de protocolo 072/14. Vinte e seis ejaculados provenientes de 26 reprodutores de linhagens comerciais (Agroceres, DB e Genetiporc), com idade entre 18 e 48 meses e pertencentes a uma granja comercial foram utilizados. Os animais estavam alojados em baias individuais com 2,75 m de comprimento, 2,10 m de largura e 1,30 m de altura, delimitadas com grades, e receberam diariamente 3,0 kg de ração específica para reprodutores, dividida em dois arraçoamentos, às 8 horas e às 14 horas. Água foi fornecida *ad libitum*. Todos os animais eram clinicamente saudáveis e de fertilidade comprovada, utilizados na rotina da granja para IA.

A coleta seminal foi realizada pelo método da mão enluvada (HANCOCK; HOWELL, 1959) seguindo a rotina normal da granja, em sala específica, com auxílio de um manequim fixo. O intervalo entre coletas foi de cinco dias. Antes da coleta, a higienização do prepúcio foi realizada através da pressão manual no sentido da abertura prepucial e limpeza da região com papel toalha descartável. Em seguida, foi realizado um *swab* na região interna do prepúcio e o material foi armazenado em caixas térmicas sem refrigeração. O sêmen foi então coletado e depositado em frasco/recipiente graduado (mL) não estéril, com capacidade para 500 mL, pré-aquecido a 37 °C e protegido por recipiente

isotérmico (copo térmico). Durante a coleta, foi feita a separação da fração gelatinosa do ejaculado por meio de filtro específico (MINITUB do Brasil LTDA[®], Porto Alegre, Brasil) adaptado ao frasco coletor, sendo toda a fração espermática utilizada nesse estudo.

No laboratório da granja, amostras de 10 mL do sêmen *in natura* foram obtidas, depositadas em tubos cônicos e armazenadas em caixas térmicas sem refrigeração e encaminhados, juntamente com o material do *swab* prepucial, ao Laboratório de Microbiologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFLA para realização das análises microbiológicas. Em seguida, amostras do ejaculado foram retiradas para a avaliação inicial de motilidade e intensidade do movimento a partir da observação subjetiva de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula e concentração com o auxílio da câmara de Neubauer. Os ejaculados considerados aptos (motilidade maior que 85%) foram então diluídos em BTS[®] modificado (sem adição de antibiótico) previamente aquecido a 37 °C na proporção de 1:1, acondicionados em recipientes isotérmicos e então encaminhados ao Laboratório de Reprodução em Suínos do Setor de Fisiologia e Farmacologia Veterinária do DMV da UFLA, onde foram realizadas as avaliações da qualidade seminal.

2.2 Procedimento experimental

No Laboratório de Reprodução de Suínos, a concentração espermática foi novamente mensurada com o auxílio da câmara de Neubauer para calcular o volume do sêmen que seria utilizado para

compor as doses inseminantes com três bilhões de espermatozoides. A esse volume, foi adicionado novamente o diluente BTS[®] modificado previamente aquecido a 37 °C até completar 80 mL. As doses foram levemente homogeneizadas e mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz por 90 minutos. Em seguida, foram armazenadas em geladeira a 15 °C.

Avaliações da qualidade espermática foram realizadas após a diluição e também após 72 horas de armazenamento, uma alíquota de 10 mL do sêmen foi aquecida em tubos de ensaio em banho-maria a 37 °C para a avaliação da qualidade seminal. Nesse momento, uma alíquota de 1 mL do sêmen foi retirada e encaminhada ao laboratório de Microbiologia Veterinária (DMV/UFLA) em recipiente isotérmico sem refrigeração. Aos 10 minutos de incubação, foram retiradas amostras para avaliações microscópicas do sêmen. Aos 60 minutos de incubação foram coletadas amostras para determinar a concentração de ácido dialdeídomalônico (MDA). O consumo de glicose pelas células espermáticas foi avaliado pela diferença na concentração desse carboidrato aos 10 e aos 120 minutos de incubação.

2.3 Avaliações microscópicas do sêmen

Os parâmetros cinéticos dos espermatozoides foram analisados pelo sistema CASA (*Sperm Classe Analyzer SCA 5.0*, Microptic, Barcelona, Espanha), acoplado a um microscópio de contraste de fases com mesa aquecida a 37 °C. Para realização do teste, 3,0 µL de sêmen foi depositado em uma lâmina específica (Leja[®] 20 micron - Microptic,

Barcelona, Spain) previamente aquecida à 37°C. As imagens foram capturadas no aumento de 100×, sendo analisadas a motilidade total (%), as velocidades curvilínea, linear e média ($\mu\text{m/s}$), os coeficientes retilíneo, de linearidade e de oscilação (%) e os deslocamentos de cabeça (em $\mu\text{m/s}$ e em Hz). Todas as avaliações foram realizadas em triplicata.

A viabilidade espermática (%) foi avaliada em uma gota do sêmen misturada a uma gota de corante eosina-nigrosina (eosina amarela - 205 – Vetec Química® e solução corante de nigrosina - 43925 - Sigma-Aldrich® na proporção 1:1), seguindo a metodologia de Blom (1950). Após esfregação em lâmina de microscópio, o número de células com membranas íntegras (sem cor) e células mortas (coradas) foram contabilizados em microscópio óptico de luz em aumento de 400×. A viabilidade foi representada pela porcentagem de células com membranas íntegras em relação ao número total de células contadas.

Para integridade acrossômica (%) uma alíquota de 10 μl de sêmen foi adicionada em 10 μl de corante de POPE – *Fast Green*/Rosa de Bengala (POPE et al., 1991) e incubada por 60 segundos. Após esse período, foi confeccionado um esfregaço em lâmina de microscopia, onde se avaliou o número de espermatozoides com o acrossoma íntegro (região acrossomal corada de azul) e não íntegro (região acrossomal não corada ou fracamente corada) em microscopia de contraste de fases em aumento de 1000×. Os valores foram expressos em porcentagem, considerando o número total acrossomas íntegros em relação ao número total de células avaliadas.

Para alterações morfológicas (%), algumas gotas de sêmen foram diluídas em solução formol aldeído-citrato de sódio a 3%. Posteriormente,

uma alíquota de 10 µl da solução foi colocada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio de contraste de fase em aumento de 1000×. Foram contabilizadas as alterações de acrossoma, de cauda, de cabeça e de peça intermediária e a presença de gota citoplasmática proximal. Os valores foram expressos em porcentagem, considerando o número total de alterações detectadas em relação ao número total de células avaliadas.

2.4 Avaliações bioquímicas do sêmen

A taxa de peroxidação lipídica dos espermatozoides foi determinada, utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA) como descrito por Kumaresan et al. (2006). Para avaliar a concentração de MDA, o Kit QuantiChrom™ TBARS Assay (DTBA-100 - Bioassay Systems, Hayward, CA, USA) foi utilizado, seguindo as instruções do fabricante.

A concentração de glicose no sêmen foi avaliada pela metodologia enzimático-colorimétrica, usando o método de ponto final, seguindo as recomendações do fabricante (Analisa Glicose-PP®, Gold Analisa Diagnostica, Belo Horizonte, Brasil).

2.5 Avaliações microbiológicas

A avaliação microbiológica do sêmen foi realizada seguindo o protocolo de Maroto Martín et al. (2010), com algumas modificações. Para isso, 1,0 mL de sêmen foi utilizado para preparar as diluições seriadas (1/10; 1/100 e 1/1000) em tubos contendo 9,0 mL de tampão fosfato salino (PBS – P5368; Sigma-Aldrich Co. Ltd., St. Louis, USA).

Após a diluição, 100 µL de cada diluição foram plaqueados em duplicata, em ágar sangue (ágar sangue base Sigma[®] M7408; Sigma-Aldrich Co. Ltd., St. Louis, USA), contendo 10% de sangue desfibrinado de equino) e foram incubadas a 37 °C por 48 horas. O número de colônias formadas foi contado e os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Da mesma forma que o plaqueamento foi realizado no ágar sangue, amostras de todas as diluições seriadas foram plaqueadas em placas de ágar McConkey (70133; Sigma-AldrichCo. Ltd., St. Louis, USA) para a quantificação de enterobactérias e em ágar manita hipertônico para a quantificação de *Staphylococcus* spp. Após todos os plaqueamentos, as placas foram incubadas à temperatura de 37 °C por 48 horas.

Após esse período, realizou-se o repique de cada exemplar de bactéria isolada nos três meios em superfície em ágar tripticase de soja (TSA- M290; HIMEDIA, Mumbai, India), as quais foram mantidas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, os isolados foram submetidos aos testes de catalase KOH oxidase e coloração de gram. Além desses testes, as colônias de *Staphylococcus* spp. isoladas foram submetidas à avaliação de coagulase empregando-se plasma ovino e classificadas em coagulase positiva ou negativa.

Com relação às bactérias gram-negativas isoladas, as mesmas foram repicadas em placas de ágar EMB (eosina azul de metileno), o qual foi utilizado para o isolamento de *E. coli*. Porém, a confirmação da identificação dos isolados gram-negativos (*Enterobacteriaceae*) foi realizada por meio de kits miniaturizados *BacTray*[®] (Laborclin[®], Vargem

Grande, Brasil), sendo que, para as bactérias oxidases negativas, foram utilizados os kits *Bactray*[®] I e II (880108, 880109; Laborclin[®], Vargem Grande, Brasil) e para as oxidases positivas o kit *Bactray*[®] III (880110; Laborclin[®], Vargem Grande, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a avaliação microbiológica do prepúcio, os *swabs* foram inoculados em ágar sangue, ágar McConkey e ágar manita hipertônico e incubados durante 48h a 37 °C. As análises dos isolados foram iguais as descritas anteriormente para a cultura seminal.

2.6 Análises estatísticas

Os valores obtidos foram expressos como média \pm desvio-padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas usando o programa estatístico Action versão 2.7. A normalidade e homogeneidade das variâncias foram avaliadas pelos testes de Kolmogorov–Smirnov e Levene, respectivamente. Por não atingirem a normalidade, o teste de Spearman foi utilizado para correlacionar a quantidade de cada bactéria com os parâmetros de qualidade do sêmen.

3 RESULTADOS

3.1 Características das amostras analisadas

Os resultados das análises microbiológicas revelaram que a maioria das amostras do prepúcio analisadas continha de duas a quatro espécies diferentes de bactérias (Figura 1). A espécie de bactéria mais frequente no prepúcio foi a *Staphylococcus spp.* (85%), seguida da *Proteus mirabilis* (54%), *Pseudomonas aeruginosa* (38%) e *Burkholderia cepacia* (35%) (Tabela 1). Já no sêmen *in natura*, o número de bactérias identificadas variou de um a seis tipos diferentes, sendo que as bactérias mais frequentes foram *Staphylococcus spp.* e *Proteus mirabilis* (77%), seguida da *Burkholderia cepacia* (35%) e *Morganella morganii* (31%). No sêmen armazenado a 15 °C durante 72 horas, o número de bactérias variou de um a cinco tipos diferentes, sendo que a maioria se encontrou entre um e três tipos. As bactérias mais frequentes foram *Proteus mirabilis* (96%), seguido da *Morganella morganii* (31%) e *Staphylococcus spp.* (27%). Os valores de UFC/mL obtidos com o sêmen resfriado por 72 horas foram numericamente superiores aos valores obtidos com o sêmen *in natura*.

3.2 Sêmen diluído – 0 hora fresco diluído

As características do sêmen diluído e das doses inseminantes armazenadas a 15 °C durante 72 horas estão apresentadas na Tabela 2, enquanto que os valores de correlação entre a presença de bactérias no

sêmen *in natura* com a qualidade seminal do sêmen fresco diluído estão apresentados na Tabela 3. Todas as correlações significativas variaram de 0,39 a 0,54, positivas ou negativas. A bactéria que mostrou maior número de correlações foi a *Pseudomonas putida*, seguida da *Burkholderia cepacia* e da *Providencia rettgeri*. A *P. putida* mostrou correlação negativa ($P < 0,05$) com a motilidade espermática, embora tenha mostrado correlações positivas com a viabilidade espermática. Essa bactéria também teve correlação negativa ($P < 0,05$) com o deslocamento de cabeça. Já a *B. cepacia* mostrou correlações positivas ($P < 0,05$) com a velocidade média e curvilínea da célula espermática e integridade acrossomal, mas negativa ($P < 0,05$) em relação ao teor de dialdeído malônico. A *P. rettgeri* mostrou correlações positivas com as velocidades média e curvilínea e também com o deslocamento de cabeça, embora tenha apresentado correlações negativas com a viabilidade espermática. A *Escherichia coli* mostrou correlação positiva ($P < 0,05$) com o consumo de glicose, enquanto que a *Pseudomonas aeruginosa* apresentou correlação negativa com o total de alterações morfológicas no sêmen e positiva com o teor de dialdeído malônico.

3.3 Sêmen processado e armazenado

As correlações encontradas entre as bactérias identificadas no sêmen processado e armazenado por 72 horas a 15 °C variaram de 0,37 a 0,48, valores positivos ou negativos (Tabela 4). O maior número de correlações foi encontrado com a *Proteus mirabilis*, a qual mostrou correlação negativa ($P < 0,05$) com as características dos movimentos dos

espermatozoides e positivo ($P < 0,05$) com o total de alterações morfológicas espermáticas, embora também tenha apresentado valores positivos ($P < 0,05$) com a viabilidade espermática e porcentagem de acrossomas íntegros no sêmen. A *Pseudomonas putida* e a *Comamonas testosteroni* apresentaram correlações negativas ($P < 0,05$) com a motilidade espermática, embora essa última tenha mostrado correlação positiva com a porcentagem de acrossomas íntegros. A *Escherichia coli* apresentou correlações negativas ($P < 0,05$) com a viabilidade espermática e porcentagem de acrossomas íntegros, enquanto que a *Acinetobacter baumannii calcoaceticus* apresentou correlação positiva ($P < 0,05$) com o teor de dialdeído malômico e consumo de glicose pelos espermatozoides. A *Morganella morganii* apresentou correlação positiva ($P < 0,05$) com a viabilidade espermática enquanto que a *Staphylococcus spp* apresentou correlação negativa com o consumo de glicose.

4 DISCUSSÃO

A contaminação do sêmen durante o procedimento de coleta e processamento das doses inseminantes é inevitável (ALTHOUSE; LU, 2005). Além disso, as condições em que o sêmen permanece armazenado favorecem a proliferação microbiana. Dessa forma, o sêmen é normalmente colonizado por uma variedade de microrganismos que podem afetar a qualidade seminal (MAES et al., 2008). Nesse sentido, a evidência de que possam haver microrganismos benéficos à qualidade do sêmen tem sido motivo de estudos (BARBONETTI et al., 2011).

No presente trabalho, observou-se que as bactérias mais frequentemente encontradas no sêmen *in natura* foram *Staphylococcus* spp. e *Proteus mirabilis* (77%), *Burkholderia cepacia* (35%) e *Morganella morganii* (31%). Em outros estudos, os gêneros *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus* spp. (ALTHOUSE; LU, 2005; ARREDONDO et al., 2001; SONE et al., 1989; TAMULI; SHARMA; RAJKONWAR, 1984), *Escherichia coli* e *Serratia* spp. (BRESCIANI et al., 2014; MAROTO MARTÍN et al., 2010) foram os mais encontrados. Ao se observar as bactérias encontradas com maior frequência no swab prepucial (*Staphylococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*) no presente trabalho, sugere-se que o prepúcio seja uma importante fonte de contaminação do sêmen. Porém, o fato de que um número maior de gêneros bacterianos tenha sido encontrado no sêmen *in natura* (17 no total) em relação ao prepúcio (10 no total) mostra que o ambiente também é uma fonte de contaminação. De fato, Dias et al. (2000) observaram que medidas de higiene pré-coleta

seminal reduziram a contaminação no ejaculado de 1800 UFC/mL para 500 UFC/mL, corroborando com os resultados do presente estudo de que tanto o ambiente quanto o prepúcio representam importantes fontes de contaminação.

Com relação ao sêmen resfriado por 72 horas, as bactérias mais frequentes foram *Staphylococcus* spp., *Proteus mirabilis* e *Morganella morganii*. A maior quantidade de UFC/mL em relação ao sêmen *in natura* se deve à ausência de antibióticos ao diluente. As bactérias que apresentaram maior proliferação foram a *Pseudomonas putida*, *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis*. Esses resultados sugerem que as condições de armazenamento do sêmen suíno sejam mais favoráveis para essas bactérias do que para as demais.

Importantes correlações entre os gêneros bacterianos e as características seminais foram encontradas no presente trabalho, tanto no sêmen fresco quanto no sêmen armazenado. Os valores de correlação encontrados (0,37 e 0,54) são considerados médios (COHEN, 1988) e sugerem que a contaminação bacteriana não é o principal fator relacionado à qualidade do sêmen, mas deve ser considerado (ÚBEDA et al., 2013). No sêmen fresco, a *P. putida* mostrou correlação positiva com a viabilidade espermática, porém, negativa com a motilidade. Já a *P. rettgeri* mostrou correlações negativas com a viabilidade espermática. Na literatura, tanto a redução da motilidade quanto da viabilidade espermática foram observadas por Sepúlveda et al. (2014) ao adicionarem *Pseudomonas aeruginosa* ao sêmen suíno, sugerindo o efeito deletério dessa bactéria à qualidade seminal. Vários estudos demonstram que a contaminação contínua de bactérias da família *Enterobacteriaceae* levam

ao aparecimento de apoptose nos espermatozoides, diminuindo a vida útil espermática e conseqüentemente o desempenho reprodutivo do rebanho (ALTHOUSE; LU, 2005; MAROTO MARTÍN et al., 2010; MONGA; ROBERTS, 1994; VILLEGAS et al., 2005; WOLFF et al., 1993). Tais efeitos foram atribuídos às substâncias nocivas produzidas pelas bactérias, como a hemolisina e toxina *shiga-like* (SCHULZ et al., 2010).

Já a *B. cepacia* no sêmen fresco apresentou correlações positivas com a velocidade espermática e integridade acrossômica e negativa com o teor de MDA. Já no sêmen armazenado, esse resultado não pode ser observado, já que apenas uma amostra foi positiva para essa bactéria. Os efeitos positivos da *B. cepacia* com a qualidade do sêmen suíno podem ser atribuídos a algum efeito antioxidante dessa bactéria, já que houve redução do teor de MDA nas amostras contaminadas. Por outro lado, Althouse et al. (2000) observaram maior incidência de acrossomas danificados e menor motilidade no sêmen suíno quando essa bactéria estava presente. Esses resultados sugerem que novas pesquisas sejam necessárias para elucidar o verdadeiro papel da *B. cepacia* na qualidade seminal.

Já no sêmen resfriado por 72 horas, a *P. mirabilis* foi a bactéria que mais influenciou a qualidade seminal, tendo sido encontrada em 96% das amostras analisadas. Correlações negativas com características dos movimentos dos espermatozoides e positiva com o total de alterações morfológicas espermáticas foram observadas, resultados semelhantes aos encontrados em outros estudos (ÚBEDA et al., 2013; YANIZ et al., 2010). Da mesma maneira, a *E. coli* também apresentou correlações negativas, porém, com a viabilidade espermática e com a porcentagem de

acrossomas íntegros. Esses resultados também foram observados por outros trabalhos (BUSSALLEU et al., 2011; MAROTO MARTÍN et al., 2010; YÁNIZ et al., 2010).

A maioria das bactérias contaminantes do sêmen são bactérias gram-negativas (ALTHOUSE et al., 2005; CSEH; FAIGL; AMIRIDIS, 2012) que, durante seu metabolismo, podem liberar lipopolissacarídeos (LPS) que possuem ação citotóxicas (OSBORN, 1964; RIETSCHER et al., 1994) sobre a célula espermática. Apesar de os parâmetros seminais serem negativamente influenciados pela maioria das bactérias, algumas características seminais, como integridade de membrana e integridade acrossomal dos espermatozoides tiveram correlações positivas com algumas bactérias.

Trabalhos que comprovam os efeitos benéficos das bactérias sobre a qualidade seminal são reportados na literatura. Barbonetti et al. (2011) verificaram efeito positivo da presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* na qualidade do sêmen humano, já que houve redução da taxa peroxidativa de lipídeos nos espermatozoides e, conseqüentemente, manutenção da motilidade e da viabilidade do sêmen por mais tempo. Entretanto, os autores não enfatizaram o real mecanismo dessa redução peroxidativa.

No presente estudo, comprovou-se que algumas bactérias estão positivamente correlacionadas com algumas características do sêmen suíno, porém, as vias pelas quais esses microrganismos atuam são desconhecidas. Assim, estudos com a inoculação de bactérias específicas como *Burkholderia cepacia* e *Morganella morganii* ao sêmen suíno

devem ser conduzidos na tentativa de elucidar o verdadeiro papel dessas bactérias nas características das doses inseminantes.

5 CONCLUSÃO

As bactérias encontradas no sêmen suíno influenciam a qualidade do sêmen suíno fresco ou resfriado a 15 °C por 72 horas. A *B. cepacia* e a *M. morgani* são as bactérias que melhoram a qualidade do sêmen fresco e do sêmen armazenado, respectivamente. A *P. putida* é a bactéria que causa maiores injúrias no sêmen fresco, enquanto que a *P. mirabilis*, a *P. putida*, a *C. testosteroni*, a *E. coli* e a *A. baumannii* as que causam maiores prejuízos ao sêmen armazenado. Há relação entre as bactérias encontradas no sêmen com aquelas encontradas no prepúcio, porém, o ambiente representa a maior fonte de contaminação do sêmen.

ABSTRACT

This study was conducted with the objective of verifying the influence of bacteriospermia over the quality of porcine semen, fresh or stored at 15°C for 72 hours. To do this, 26 ejaculates originated from 26 reproducers were used. Subsequently, the ejaculates were diluted in BTS with no antibiotics in order to obtain inseminating doses containing three billion spermatozooids per inseminating dose. Spermatic quality evaluations were conducted after dilution and after 72 hours of storage, in addition to seminal microbiological evaluation. Each identified microorganism was correlated with the semen quality parameters by means of the Spearman correlation test. In the *in natura* semen, we identified from one to six typed of bacteria, being *Staphylococcus* spp. (77% of the samples) and *Proteus mirabilis* (77%) the most frequent, followed by *Burkholderia cepacia* (35%) and *Morganella morganii* (31%). In the semen stored for 72 hours, we identified from one to five types of bacteria, being *Proteus mirabilis* (96% of the samples) the most frequent, followed by *Morganella morganii* (31%) and *Staphylococcus* spp. (27%). The values for total CFU/mL obtained from the stored semen were numerically superior to those obtained from the *in natura* semen. In the fresh diluted semen, the *Pseudomonas putida* showed negative correlation with mobility, and positive correlation with sperm viability, while *Burkholderia cepacia* presented positive correlation with spermatic cell motility and acrosome integrity, and negative correlation in relation to the content of malonic dialdehyde in the semen. In the stored semen, *Proteus mirabilis* showed negative correlations with spermatic motility and positive correlations with total morphological changes, sperm viability and percentage of whole acrosomes. *Pseudomonas putida* and *Comamonas testosterone* presented negative correlations with spermatic motility. *Escherichia coli* presented negative correlations with sperm viability and percentage of whole acrosomes, while *Acinetobacter baumannii calcoaceticus* presented positive correlation with the content of malonic dialdehyde and glucose consumption by the spermatozoa. *Morganella morganii* presented positive correlation with sperm viability. We conclude that, depending on the species of bacteria, bacteriospermia can influence the quality of porcine semen, fresh or stored for 72 hours at 15°C. *B. cepacia* and *M. morganii* improve the quality of diluted fresh semen and of semen stored for 72 hours, respectively. *P. putida* causes higher damage to fresh semen, while *P. mirabilis*, *P. putida*, *C. testosterone*, *E. coli* and *A. baumannii* cause higher damage to stored semen.

Keywords: Bacteria. Sperm. Reproduction. Boar.

REFERÊNCIAS

- ALTHOUSE, G. C. Sanitary procedures for the production of extended semen. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v. 43, n. 2, p. 374-378, July 2008.
- ALTHOUSE, G. C. et al. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. **Theriogenology**, New York, v. 53, n. 5, p. 1167-1176, Mar. 2000.
- ALTHOUSE, G. C.; LU, K. G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 2, p. 573-584, Jan. 2005.
- ARREDONDO, C. et al. Bacteriological studies of swine semen. Preliminar evaluation of the effect of *Escherichia coli* lectins on sperm agglutination. **Revista Cubana Salud Animal**, Habana, v. 23, n. 2, p. 73-79, 2001.
- BARBONETTI, A. et al. Effect of vaginal probiotic *Lactobacilli* on *in vitro*-induced sperm lipid peroxidation and its impact on sperm motility and viability. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, n. 8, p. 2485-2488, June 2011.
- BLOM, E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertility and Sterility**, New York, v. 1, p. 176 -177, 1950.
- BRESCIANI, C. et al. Boar semen bacterial contamination in Italy and antibiotic efficacy in a modified extender. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 13, n. 1, p. 83-87, Jan. 2014.
- BUSSALLEU, E. et al. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 127, n. 3/4, p. 176-182, Sept. 2011.
- CHANG, Y. H. et al. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent *in vivo* studies. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 80, n. 2, p. 193-199, Oct. 2001.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. Hillsdale: Erlbaum, 1988. 590 p.

CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G. S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 130, n. 3/4, p. 187-192, Feb. 2012.

DIAS, C. P. et al. Grau de contaminação bacteriana no ejaculado de suínos submetidos a dois métodos de higienização e coleta. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, p. 32-40, 2000.

FALAGAS, M. E. et al. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 3, n. 7, p. 657-664, July 2007.

HANCOCK, J. L.; HOWELL, G. J. R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, London, v. 71, n. 5, p. 664-665, 1959.

KNOX, R. V. Artificial insemination in pigs today. **Theriogenology**, New York, v. 85, n. 1, p. 83-93, Jan. 2016.

KUMARESAN, A. et al. Effect of oviductal proteins on sperm functions and lipid peroxidation levels during cryopreservation in buffaloes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 93, n. 3/4, p. 246-257, Sept. 2006.

LÓPEZ RODRÍGUEZ, A. et al. Effect of dilution temperature on boar semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n. 5, p. e63-e66, Oct. 2012.

MAES, D. et al. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. **Theriogenology**, New York, v. 70, n. 8, p. 1337-1345, Nov. 2008.

MAROTO MARTÍN, L. O. et al. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 120, n. 1/4, p. 95-104, July 2010.

MONGA, M.; ROBERTS, J. A. Sperm agglutination by bacteria: receptor-specific interactions. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 151-156, Apr. 1994.

OKAZAKI, T. et al. Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. **Theriogenology**, New York, v. 74, n. 9, p. 1691-1700, Dec. 2010.

OSBORN, M. J. Lipopolysaccharide of the gram-negative cell wall. **Science**, New York, v. 145, n. 3634, p. 783-789, Aug. 1964.

POPE, C. E. et al. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 22, p. 87-95, 1991.

RIETSCHER, E. T. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB Journal**, New York, v. 8, n. 2, p. 217-225, Feb. 1994.

SCHULZ, M. et al. Effect of *Escherichia coli* and its soluble factors on mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine translocation, viability, and motility of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, New York, v. 94, n. 2, p. 619-623, July 2010.

SEPÚLVEDA, L. et al. Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 150, n. 3/4, p. 96-106, Nov. 2014.

SONE, M. et al. Effects of bacteria-contaminated boar semen on the reproductive performance. **Japan Journal of Animal Reproduction**, Tokyo, v. 35, n. 3, p. 159-164, 1989.

TAMULI, M. K.; SHARMA, D. K.; RAJKONWAR, C. K. Studies on the microbial flora of boar semen. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 61, p. 858-861, 1984.

ÚBEDA, J. L. et al. Adverse effects of members of the *Enterobacteriaceae* family on boar sperm quality. **Theriogenology**, New York, v. 80, n. 6, p. 565-570, Oct. 2013.

VILLEGAS, J. et al. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. **Apoptosis**, London, v. 10, n. 1, p. 105-110, Jan. 2005.

WOLFF, H. et al. Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and E. coli. **Fertility and Sterility**, New York, v. 60, n. 1, p. 154-158, July 1993.

YÁNIZ, J. et al. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effect on sperm quality during storage at 15°C. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 122, n. 1/2, p. 142-149, Oct. 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Tabelas e Figuras

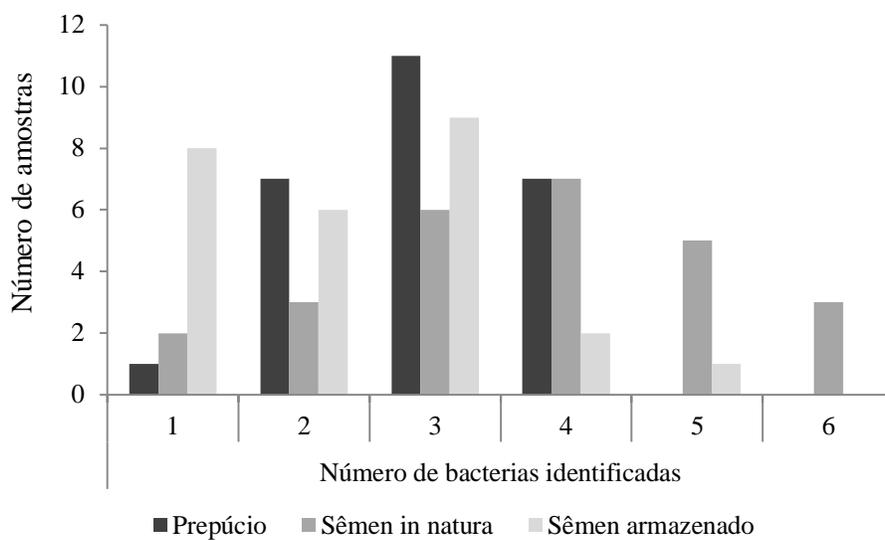


Figura 1. Número de amostras de prepúcio de varrões, sêmen *in natura* e sêmen armazenado por 72 horas identificada com diferentes espécies de bactérias. Quantidade total de amostras analisadas = 26.

Tabela 1. Número de isolamentos (n), frequência (%) e unidades formadoras de colônias (UFC/mL \pm DP) de espécies de microrganismos isolados em 26 amostras de prepúcio (*swab*), sêmen *in natura* e sêmen resfriado* de varrões.

	Prepúcio		Sêmen <i>in natura</i>			Sêmen resfriado*		
	n	%	n	%	UFC/mL	n	%	UFC/mL
<i>Acinetobacter baumannii calcoaceticus</i>	5	19	5	19	50 \pm 75	4	15	12.903 \pm 24.739
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	15	3	12	55 \pm 56	-	-	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	9	35	9	35	28 \pm 27	1	4	10.000
<i>Citrobacter</i> spp.	-	-	1	4	10	-	-	-
<i>Comamonas testosteroni</i>	-	-	1	4	20	2	8	16.000 \pm 5.657
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	1	4	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	1	4	10.000
<i>Escherichia coli</i>	4	15	7	27	63 \pm 97	2	8	8.000 \pm 9.899
<i>Flavobacterium</i> spp.	-	-	1	4	10	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	4	2	8	12 \pm 11	1	4	1000
<i>Morganella morganii</i>	3	12	8	31	11 \pm 12	8	31	509.429 \pm 1.103.118
<i>Proteus mirabilis</i>	14	54	20	77	66 \pm 134	25	96	437.696 \pm 997.799
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	1	4	1	2	8	5.000
<i>Providencia alcalitaciens</i>	-	-	1	4	10	-	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	4	15	163 \pm 257	1	4	1.700
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	38	6	23	41 \pm 52	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	3	12	25 \pm 18	3	12	1.103.333 \pm 1.648.949
<i>Serratia</i> spp.	-	-	-	-	-	1	4	500
<i>Staphylococcus</i> spp.	22	85	20	77	81 \pm 221	7	27	34 \pm 34
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	12	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	1	4	3	-	-	-

* Dose inseminante de 80 mL contendo 3 bilhões de espermatozoides e armazenado a 15°C durante 72 horas.

Tabela 2. Qualidade do sêmen suíno (média \pm DP) diluído antes e após o armazenamento a 15 °C por 72 horas. (n = 25).

	Sêmen diluído	72 horas
Motilidade total (%)	89,1 \pm 11,5	76,2 \pm 16,1
Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$)	56,8 \pm 15,9	50,8 \pm 18,4
Velocidade linear ($\mu\text{m/s}$)	32,7 \pm 10,9	26,9 \pm 11,8
Velocidade média ($\mu\text{m/s}$)	44,3 \pm 13,5	38,2 \pm 14,7
Coefficiente de linearidade (%)	0,56 \pm 0,13	0,52 \pm 0,15
Coefficiente retilíneo (%)	0,70 \pm 0,10	0,66 \pm 0,12
Coefficiente de oscilação (%)	0,77 \pm 0,09	0,73 \pm 0,11
Deslocamento da cabeça (μm)	2,17 \pm 0,52	2,05 \pm 0,67
Deslocamento da cabeça (Hz)	5,89 \pm 1,09	5,24 \pm 1,11
Viabilidade espermática (%)	86,5 \pm 6,29	78,3 \pm 12,2
Acrossomas íntegros (%)	96,4 \pm 1,9	87,9 \pm 6,3
Alterações morfológicas (%)	9,40 \pm 6,20	9,08 \pm 5,42
Teor de malondialdeído (μM)	18,9 \pm 3,62	20,5 \pm 1,7
Consumo de glicose	39,4 \pm 27,9	36,6 \pm 27,3

Tabela 3. Valores de correlação de Spearman entre os principais microrganismos (em UFC/mL) no sêmen fresco dos varrões com as características seminais.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
Motilidade total (%)	0,35	-0,31	0,31	0,14	-0,20	0,20	0,31	0,27	0,19	0,02	-0,14	0,11	-0,03	-0,11	-0,41*	0,16	-0,03
Velocidade curvilínea (µm/s)	0,04	-0,36	0,40*	0,28	0,20	-0,08	0,06	0,08	0,03	0,35	-0,23	0,00	0,50*	-0,27	-0,07	0,16	0,31
Velocidade linear (µm/s)	-0,02	-0,08	0,38	0,28	-0,14	0,00	0,11	-0,06	-0,10	0,19	0,17	-0,11	0,25	-0,25	0,02	0,03	0,34
Velocidade média (µm/s)	-0,01	-0,35	0,39*	0,31	0,17	-0,08	0,11	-0,04	-0,08	0,38	-0,14	-0,11	0,45*	-0,24	0,00	0,12	0,34
Coefficiente de linearidade (%)	0,04	0,07	0,04	0,00	-0,31	0,23	0,06	-0,20	-0,25	-0,16	0,31	-0,23	-0,23	0,10	0,45*	-0,11	0,14
Coefficiente retilíneo (%)	0,02	0,09	0,01	0,03	-0,31	0,23	0,08	-0,18	-0,22	-0,21	0,34	-0,17	-0,19	0,05	0,43*	-0,13	0,17
Coefficiente de oscilação (%)	0,08	-0,03	0,08	-0,11	-0,17	0,20	0,11	-0,22	-0,35	-0,06	0,28	-0,23	-0,15	0,14	0,47*	-0,18	0,08
Deslocamento da cabeça (µm)	0,06	-0,33	0,18	0,28	0,25	-0,30	0,06	0,20	0,18	0,16	-0,28	0,17	0,54*	-0,24	-0,41*	0,26	0,31
Deslocamento da cabeça (Hz)	0,21	-0,23	0,30	0,14	-0,20	0,05	0,11	0,22	0,05	-0,22	0,17	-0,06	0,09	-0,12	-0,19	-0,08	0,31
Viabilidade espermática (%)	-0,09	-0,17	0,28	-0,20	-0,26	0,13	0,24	0,16	-0,15	-0,09	-0,11	0,16	-0,41*	0,24	0,41*	-0,24	-0,34
Acrossomas íntegros (%)	-0,31	0,03	0,49*	0,22	-0,20	0,00	0,01	-0,22	-0,14	0,22	0,01	-0,20	-0,45	-0,12	0,17	-0,06	-0,35
Alterações morfológicas (%)	0,09	-0,09	0,09	-0,01	0,26	-0,10	-0,11	0,05	0,13	0,02	0,10	0,14	-0,12	0,39*	-0,13	-0,22	-0,21
Teor de malondialdeído (µM)	0,06	0,25	-0,49*	-0,23	-0,26	-0,09	0,03	-0,02	-0,33	-0,09	-0,03	-0,17	-0,07	0,44*	0,00	-0,02	-0,07
Consumo de glicose (mg/dl)	0,14	0,05	0,15	0,03	0,06	0,41*	-0,06	0,06	0,04	-0,11	0,20	0,11	-0,12	-0,09	0,03	0,00	-0,28

A. *Acinetobacter baumannii calcoaceticus*; **B.** *Aeromonas hydrophila*; **C.** *Burkholderia cepacia*; **D.** *Citrobacter spp.*; **E.** *Comamonas testosteroni*; **F.** *Escherichia coli*; **G.** *Flavobacterium spp.*; **H.** *Klebsiella oxytoca*; **I.** *Morganella morganii*; **J.** *Proteus mirabilis*; **K.** *Proteus vulgaris*; **L.** *Providencia alcalitaciens*; **M.** *Providencia rettgeri*; **N.** *Pseudomonas aeruginosa*; **O.** *Pseudomonas putida*; **P.** *Staphylococcus spp.*; **Q.** *Streptococcus spp.*

* P<0,05

Tabela 4. Valores de correlação de Spearman entre os principais microrganismos (em UFC) no sêmen suíno armazenado por 72 horas a 15 °C com as características seminais.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Motilidade total (%)	-0,02	-0,14	-0,43*	-0,08	-0,06	-0,04	0,34	-0,04	-0,11	-0,25	0,00	-0,50**	0,06	-0,02
Velocidade curvilínea (µm/s)	-0,22	0,11	-0,33	-0,06	0,23	0,39	0,28	-0,07	-0,33	-0,14	0,31	-0,44*	-0,28	0,07
Velocidade linear (µm/s)	0,13	0,00	-0,07	0,11	0,20	0,36	-0,11	-0,31	-0,48*	0,17	0,31	-0,33	-0,28	-0,08
Velocidade média (µm/s)	-0,11	0,08	-0,15	0,06	0,14	0,34	0,20	-0,12	-0,47*	-0,11	0,34	-0,43	-0,28	0,07
Coeficiente de linearidade (%)	0,28	-0,14	0,35	0,17	-0,11	0,05	-0,28	-0,30	-0,44*	0,11	0,20	-0,07	0,00	0,06
Coeficiente retilíneo (%)	0,31	-0,23	0,33	0,17	-0,08	0,07	-0,28	-0,30	-0,39*	0,06	0,20	-0,06	0,11	0,11
Coeficiente de oscilação (%)	0,04	-0,08	0,31	0,14	0,03	0,10	-0,03	-0,13	-0,48*	-0,06	0,11	-0,13	-0,23	0,08
Deslocamento da cabeça (µm)	-0,27	0,17	-0,31	0,00	0,23	0,37	0,31	-0,03	-0,13	-0,14	0,28	-0,28	-0,28	0,00
Deslocamento da cabeça (Hz)	0,04	0,11	-0,11	0,23	-0,03	0,17	0,08	-0,32	-0,37	-0,17	0,28	-0,36	-0,23	0,08
Viabilidade espermática (%)	-0,02	0,24	0,04	0,09	-0,34	-0,41*	-0,18	0,46*	0,46*	-0,26	-0,23	0,09	-0,14	-0,07
Acrossomas íntegros (%)	0,04	0,23	0,40*	0,14	-0,28	-0,45*	-0,09	0,23	0,45*	-0,20	-0,34	0,20	-0,13	-0,01
Alterações morfológicas (%)	0,07	-0,04	0,03	-0,16	0,03	-0,09	-0,26	0,32	0,43*	0,14	-0,16	0,21	-0,16	-0,34
Teor de malondialdeído (µM)	0,43*	-0,33	0,08	0,34	0,31	0,10	-0,33	0,09	-0,24	0,23	-0,20	-0,16	0,03	0,02
Consumo de glicose (mg/dl)	0,41*	-0,17	-0,13	0,03	0,25	0,13	-0,31	-0,29	0,04	0,34	-0,08	0,07	0,08	-0,42*

A. *Acinetobacter baumannii calcoaceticus*; **B.** *Burkholderia cepacia*; **C.** *Comamonas testosteroni*; **D.** *Enterobacter aerogenes*; **E.** *Enterobacter cloacae*; **F.** *Escherichia coli*; **G.** *Klebsiella pneumoniae*; **H.** *Morganella morganii*; **I.** *Proteus mirabilis*; **J.** *Proteus vulgaris*; **K.** *Providencia rettgeri*; **L.** *Pseudomonas putida*; **M.** *Serratia* spp.; **N.** *Staphylococcus* spp.

* P<0,05; ** P<0,01