

**POPULAÇÃO BACTERIANA, MOTILIDADE
ESPERMÁTICA E FERTILIDADE DE SÊMEN
DE PIRACANJUBA *Brycon orbignyanus*
(VALENCIENNES, 1849) SUBMETIDO AO
RESFRIAMENTO**

ZIARA APARECIDA ISAÚ

2006

ZIARA APARECIDA ISAÚ

**POPULAÇÃO BACTERIANA, MOTILIDADE ESPERMÁTICA E
FERTILIDADE DE SÊMEN DE PIRACANJUBA *Brycon orbignyanus*
(VALENCIENNES, 1849) SUBMETIDO AO RESFRIAMENTO**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Mestrado em Medicina Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de “Mestre”

Orientadora

Profa. PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Isaú, Ziara Aparecida

População bacteriana, motilidade espermática e fertilidade de sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849) submetido ao resfriamento / Ziara Aparecida Isaú. – Lavras : UFLA, 2006.

94 p. : il.

Orientadora: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Sêmen. 2. Peixe. 3. Resfriamento. 4. Bactérias. 5. Antibióticos. 6. *Brycon*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.3752

ZIARA APARECIDA ISAÚ

**POPULAÇÃO BACTERIANA, MOTILIDADE ESPERMÁTICA E
FERTILIDADE DE SÊMEN DE PIRACANJUBA *Brycon orbignyanus*
(VALENCIENNES, 1849) SUBMETIDO AO RESFRIAMENTO**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Mestrado em Medicina Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de “Mestre”

APROVADA em 31 de agosto de 2006.

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo UFLA

Prof. Dr. Hugo Pereira Godinho ICB/UFMG

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas UFLA

Profa. PhD Ana Tereza de Mendonça Viveiros
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Dedico este trabalho a Deus, por abençoar a minha vida com a oportunidade de alcançar este conhecimento, por me capacitar e tornar possível sua realização; aos meus pais, Ivanir e Dilza, pelo apoio e compreensão e a todos os amigos(as) que torceram para que este trabalho fosse bem sucedido.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

À Profa. PhD. Ana Tereza de Mendonça Viveiros, pela atenção, orientação e companheirismo durante todo este trabalho.

Ao Prof. Dr Henrique César Pereira Figueiredo, pelo apoio irrestrito e orientação durante todo o trabalho.

Ao Prof. Dr Rilke Tadeu Fonseca de Freitas, pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr Francisco Duque de Mesquita Neto, pela atenção e disposição para o enriquecimento do trabalho.

Ao Prof. Dr Antônio Marcos Guimarães, pelo apoio e incentivo na realização do mestrado.

Aos colegas, Alexandre N. Maria, Laura H. Orfão, Marco Aurélio S. Leite, João Fernando Koch, Rafael V. Araújo e Halan Denni Dal Pupo, pela ajuda.

A amiga Dircéia, funcionária do Laboratório de Doenças dos Animais Aquáticos (AQUAVET), pela ajuda sempre presente.

À equipe da Estação de Piscicultura da CEMIG, Gilson, Jailson e Darli, em especial ao Sr. Oscar Moura, pela valiosa colaboração.

À Coordenadoria de Apoio a Pesquisa (CAPES), pela bolsa de estudos.

À Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), que colaborou para a realização deste trabalho por meio de financiamentos concedidos ao Laboratório AQUAVET- DMV/UFLA.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	ii
RESUMO GERAL	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1- Introdução Geral	1
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 A espécie em estudo	5
3.2 Espermatozóides e plasma seminal	7
3.3 Influência do pH do plasma seminal	11
3.4 Preservação do sêmen através do resfriamento	12
3.5 Contaminação do sêmen por microrganismos e sua prevenção	14
3.6 Uso de antibióticos no sêmen resfriado	16
3.7 Exemplos de antibióticos utilizados em diluidores de sêmen	17
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO 2 - Avaliação bacteriana do sêmen de piracanjuba <i>Pisces</i> : <i>Brycon orbignyanus</i> , durante o resfriamento	31
1 RESUMO	32
2 ABSTRACT	34
3 INTRODUÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
5 RESULTADOS	44
6 DISCUSSÃO	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO 3 - Estudo bacteriológico do sêmen de piracanjuba <i>Brycon</i> <i>orbignyanus</i> submetido ao resfriamento	61
1 RESUMO.....	62
2 ABSTRACT	63
3 INTRODUÇÃO	64
4 MATERIAL E MÉTODOS	65
5 RESULTADOS	68
6 DISCUSSÃO	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

“... Continua...”

CAPÍTULO 4 – Conclusão geral	75
1 Resfriamento de sêmen e fertilização artificial	76
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO A	82
ANEXO B	93

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
CAPÍTULO 1	
TABELA 1 Volume e concentração espermática do sêmen de algumas espécies brasileiras de água doce	9
TABELA 2 Alguns microrganismos detectados em sêmen de diferentes espécies de animais	15
CAPÍTULO 2	
TABELA 1.Motilidade (expressa em porcentagem) (média \pm desvio padrão, n = 3) do sêmen de piracanjuba diluído (1:10 volume final) em solução de Saad ajustada em diferentes pH e resfriado entre 4-6°C por 7 dias (Exp. 1)	45
TABELA 2.Variação da motilidade espermática (%), pH e crescimento bacteriano (UFCs/ml) do sêmen (n = 6) de piracanjuba diluído em solução de Saad durante 8 dias de armazenamento a 4-6°C (Exp. 2)	47
TABELA 3.Variação da motilidade espermática (%) e crescimento bacteriano (UFCs/ml) do sêmen (n = 6) de piracanjuba diluído em solução de Saad durante 8 dias de armazenamento a 4-6°C	47
TABELA 4.Motilidade (%) e crescimento bacteriano (UFC/ml) do sêmen de piracanjuba (n=8 machos) resfriado em solução de Saad em diferentes concentrações de sulfato de gentamicina, durante 8 dias de armazenamento (Exp. 4)	49
TABELA 5.Taxas de fertilização de ovócitos fertilizados com sêmen diluído em solução de Saad em diferentes concentrações de gentamicina (médias n = 4) sem armazenamento	50
CAPÍTULO 3	
TABELA 1. Caracterização das famílias das amostras bacterianas (n = 158) isoladas em sêmen de piracanjuba (n = 6 peixes) durante resfriamento 4-6°C	66
TABELA 2. Bactérias identificadas, oriundas de amostras de sêmen de piracanjuba durante resfriamento 4-6°C	67

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
CAPÍTULO 1	
FIGURA 1 Exemplar adulto de piracanjuba, <i>Brycon orbignyanus</i>	6
FIGURA 2 Espermatozóide de piracanjuba, <i>Brycon orbignyanus</i>	8
FIGURA 3 Ovócito com presença de micrópila de piracanjuba, <i>Brycon orbignyanus</i>	8
FIGURA 4 Estrutura molecular da ampicilina	18
FIGURA 5 Estrutura molecular da gentamicina	20
CAPÍTULO 2	
FIGURA 1 Motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (n = 3) diluído em solução de Saad em diferentes pHs durante resfriamento 4-6°C por 7 dias	45

RESUMO GERAL

Isaú, Ziara Aparecida. **População bacteriana, motilidade espermática e fertilidade de sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849) submetido ao resfriamento.** 2006. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, é uma espécie de peixe migratória, encontrada na bacia do rio Grande e ameaçada de extinção, que não se reproduz naturalmente em cativeiro, sendo necessária a realização de fertilização artificial. Os objetivos deste estudo foram aperfeiçoar as técnicas de resfriamento para sêmen de piracanjuba por meio da padronização do pH, uso de antibiótico e avaliar, quantitativa e qualitativamente, a presença de contaminantes bacterianos no sêmen dessa espécie. Inicialmente, foi avaliada a motilidade espermática de amostras de sêmen diluídas (1:10 v/v) em solução de Saad em diferentes pHs – 7,0; 7,6; 8,2; 8,8 - e comparados com amostras de sêmen não diluídas por 7 dias. No experimento seguinte, amostras de sêmen, diluídas em solução de Saad pH 7,6 mantidas entre 4-6°C, foram avaliadas a cada 48 horas quanto à motilidade espermática e ao crescimento bacteriano, pela inoculação de amostras em placas de Petri contendo ágar soja tripticaseína (TSA), durante 8 dias. Foram selecionadas colônias bacterianas a cada contagem de diferentes morfotipos macroscópicos, isoladas e submetidas a teste de triagem (Gram, catalase e oxidase), teste de sensibilidade *in vitro* (difusão de discos) a cinco antibióticos – penicilina, ampicilina, estreptomicina, gentamicina e lincomicina – e congeladas para identificação posterior. A partir do perfil de sensibilidade, o sulfato de gentamicina foi selecionado para adição em solução de Saad para diluição do sêmen. Foram escolhidas as concentrações de 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL de gentamicina comparadas ao controle (0 mg/mL), avaliando-se a motilidade espermática e o crescimento bacteriano no sêmen. Também foi testada a taxa de fertilização de ovócitos com sêmen diluído nessas concentrações. Observou-se que o sêmen diluído em solução de Saad pH 7,6 conservou a melhor taxa de motilidade espermática durante resfriamento. Foi observada, durante os experimentos, uma correlação negativa significativa ($P < 0,01$) entre a motilidade e o crescimento bacteriano, demonstrando que a queda na motilidade foi correlacionada ao aumento no número de bactérias no sêmen durante o resfriamento. Houve uma interação significativa entre as concentrações de gentamicina e o período de resfriamento, tendo as maiores taxas de motilidade espermática no 6º dia de armazenamento sido observadas no sêmen diluído em soluções com concentração de gentamicina acima de 0,1 mg/mL. Esta foi a menor concentração capaz de inibir completamente a

presença de bactérias no sêmen diluído e manter taxas de fertilização dos ovócitos acima de 80%. Para identificação, foram selecionadas 63 colônias de bactérias. Uma grande diversidade de espécies foi identificada, a maioria bacilos gram-negativos. Algumas espécies anteriormente observadas em muco de superfície de peixes e águas de cultivo, como as *Aeromonas* sp., um grande número de espécies da família *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter freundii* e *Enterobacter* sp., além de gram-positivas, como *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. coagulase negativos e *Enterococcus* sp. O sêmen diluído em solução de Saad com acréscimo de gentamicina em concentração acima de 0,1 mg/mL demonstrou efeito inibitório desse protocolo de diluição sobre a presença de bactérias de potencial patogênico, confirmando a importância da utilização de um antibiótico de amplo espectro para resfriamento de sêmen dessa espécie.

Palavras chaves: sêmen, peixe, resfriamento, bactérias, antibióticos, *Brycon*

*Comitê orientador: PhD Ana Teresa de Mendonça Viveiros – UFLA (orientadora); Dr. Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (co-orientador).

Abstract

Isaú, Ziara Aparecida. **Bacterial population, sperm motility and fertility of piracanjuba semen *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849) under refrigeration.** 2006. 94 p. Dissertation (MSc in Veterinary Sciences) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, is a migratory fish species originated from the Grande River basin. Piracanjuba is currently an endangered species. As this species does not breed naturally in captivity, artificial fertilization is necessary. The aim of this study was to improve the protocols for piracanjuba semen refrigeration at 4-6° C by pH standardization and antibiotic utilization, and to assess, quantitative and qualitatively, the presence of bacterial contamination on the semen. Firstly, sperm motility was evaluated on samples of semen diluted (1:10 total volume) in Saad solution with the pH adjusted to different values – 7.0, 7.6, 8.2, 8.8 – for 7 days. Then, samples diluted in Saad solution pH 7.6 and stored at 4-6°C were daily evaluated for sperm motility, and every 48h, for bacterial contamination (CFU/mL) by inoculation on tryptcasein soy agar (TSA), for 8 days. Bacterial colonies of different morphotypes were selected at each counting step, for isolation, selection test (Gram, catalase and oxidase), *in vitro* sensibility test (antibiogram) with five antibiotics – penicillin, ampicillin, estreptomycin, gentamycin and lincomycin – and frozen for posterior identification. According to the sensibility test, gentamycin was selected, added to Saad solution and used as semen extender. Concentrations of 0 (control), 0.01, 0.1, 0.5 and 1.0 mg of gentamycin per mL of Saad solution were tested. Sperm motility and bacterial growth were evaluated. To check whether gentamycin would interfere with the fertilization process, semen diluted in Saad solution containing the same concentrations tested before, was used to fertilize oocytes. Semen diluted in Saad solution pH 7.6 produced the highest sperm motility during a 7-day refrigeration period. A negative correlation ($P < 0.01$) was observed between sperm motility and bacterial growth, which indicates that the decrease in sperm motility was correlated with the increase in the number of bacteria present in the semen. There was a significant interaction between gentamycin concentrations and refrigeration time, with the highest sperm motility rates being observed after 6 days of storage when gentamycin was added at 0.1mg/mL. This was the lowest concentration able to inhibit bacterial growth in diluted semen and keep the fertilization rates above 80%. Sixty-three bacterial colonies were selected for identification. A large variety of bacterial species was observed and most of the species were rods and Gram negative. Some species commonly observed in mucus of fish surfaces and aquatic environments, such as *Aeromonas sp.* were also found. Furthermore, a large

number of species from the *Enterobacteriaceae* family (e.g. *Citrobacter freundii* and *Enterobacter sp.*), Gram positives, such as *Bacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, and coagulase negative *Staphylococcus sp.*, were found. Gentamycin at 0.1 mg/mL produced an inhibitory effect on potentially pathogenic bacteria, which confirms the importance of broad-spectrum antibiotic utilization for the refrigeration of piracanjuba semen.

Keywords: semen, fish, refrigerated, bacteria, antibiotic, *Brycon*

*Guidance committee: PhD Ana Teresa de Mendonça Viveiros – UFLA (advisor); Dr. Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (advisor).

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior concentração de água doce do mundo e uma ictiofauna vasta e exuberante. Porém, alguns aspectos ambientais, tais como a construção de barragens hidrelétricas, têm provocado danos a nossa biodiversidade aquática, especialmente um grupo de teleósteos, os peixes migratórios. Estes teleósteos são prejudicados pelas barragens em diversas fases importantes da sua vida, desde ovo e larva, até adulto para a reprodução, como é o caso da piracanjuba teleósteo da Família *Characidae* espécie *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849), alvo deste estudo.

Diante dessas circunstâncias e do crescimento acelerado da piscicultura nos últimos anos, existe uma demanda crescente por técnicas práticas e apuradas de preservação de gametas que facilitem a fertilização artificial desses animais para repovoamento dos rios e sua criação em cativeiro. O armazenamento de espermatozoides pode ser realizado em curto prazo (horas ou dias), por meio do resfriamento, a temperaturas entre 4°C-6°C ou em longo prazo, pela criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C, mantendo sua viabilidade por tempo indefinido (meses/anos), que pode variar de acordo com a espécie e o protocolo utilizados.

O resfriamento tem contribuído para o desenvolvimento e o aprimoramento da aplicação de metodologias que visam ao controle da reprodução, favorecendo a manipulação genética, o melhoramento de plantéis e a redução do estoque de machos, por tornar disponíveis os gametas por mais tempo. O resfriamento é um método prático e simples para uso na rotina de pisciculturas e programas de preservação de espécies em risco de extinção, além de facilitar as trocas de materiais genéticos entre as fazendas produtoras de pescados. No entanto, a técnica ainda é pouco utilizada.

O principal fator limitante do uso de sêmen resfriado é o seu curto período de armazenamento, evidenciado por baixas taxas de motilidade espermática. Estudos realizados no Brasil mostram que existem diferenças entre as espécies nativas, principalmente quanto ao período de estocagem e ao(s) diluidor(es) que melhor se ajusta(m) ao sêmen. Em estudos realizados com várias espécies de salmonídeos, ciprinídeos e esturjões, tem sido observado efeito do pH do sêmen sobre a motilidade espermática (Alavi & Cosson, 2005).

Outro ponto relevante no resfriamento, e ainda pouco explorado, é o uso de antibióticos nos diluidores de sêmen de peixe. Alguns trabalhos com sêmen de espécies de peixe de clima temperado têm sugerido o acréscimo de antibióticos aos diluidores. Recentemente, pesquisadores brasileiros testaram a adição de antibiótico a diluidores de sêmen, mas sem avaliar sua eficiência no controle bacteriano (Maria et al., 2006). Este é um fator importante, uma vez que a presença de bactérias tem sido citada como uma das possíveis causas do curto período de viabilidade dos espermatozoides submetidos ao resfriamento.

Dessa forma, este trabalho visa: colaborar com o aperfeiçoamento das técnicas de resfriamento para sêmen de piracanjuba pela avaliação do melhor valor de pH para armazenamento do sêmen; avaliar o padrão de comportamento da motilidade espermática na presença e ausência de contaminantes bacterianos e verificar as taxas de fertilização de ovócitos do sêmen em solução contendo antibiótico e o perfil da população bacteriana presente em amostras de sêmen resfriado dessa espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi o aperfeiçoamento de protocolo de resfriamento para sêmen de piracanjuba, pelo uso de uma solução diluidora capaz de manter a motilidade espermática por, pelo menos, 7 dias, livre de contaminantes bacterianos que não interfiram na viabilidade e na capacidade de fertilização do sêmen. Buscou-se também realizar a avaliação do melhor valor de pH para armazenamento do sêmen, avaliar o padrão de comportamento da motilidade espermática na presença e ausência de contaminantes bacterianos através do uso de antibióticos, verificar as taxas de fertilização de ovócitos do sêmen em solução contendo antibiótico e o perfil da população bacteriana presente em amostras de sêmen resfriado dessa espécie.

2.2 Objetivos específicos

Especificamente, este trabalho buscou:

- . determinar o melhor valor de pH para armazenamento de sêmen de piracanjuba durante o resfriamento;
- . determinar o nível de contaminação bacteriana do sêmen obtido por leve compressão da cavidade celomática, em peixes da espécie piracanjuba capturados durante a estação reprodutiva;
- . observar a existência de correlação entre a contaminação bacteriana e a perda da qualidade espermática do sêmen de piracanjuba, quando mantido resfriado a 4-6°C;
- . testar o uso de antibióticos associados ao protocolo de diluição para resfriamento de sêmen de peixe na inibição do crescimento bacteriano;

. testar a capacidade de fertilização do sêmen diluído em meio contendo antibiótico, utilizando-se ovócitos de fêmeas de piracanjuba obtidos por meio da indução artificial da desova;

. definir uma concentração de antibiótico eficiente na inibição bacteriana e que não interfira na motilidade espermática nem no processo de fertilização.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A espécie em estudo

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon orbignyanus*

Nome popular: Piracanjuba

A piracanjuba é encontrada nas bacias dos rios Grande, Paraná e Paraguai. Esta espécie apresenta corpo fusiforme e comprido e a boca é ampla e terminal. O dorso é castanho-escuro e apresenta uma grande mancha negra na base do pedúnculo caudal, estendendo-se até os raios caudais medianos. As nadadeiras apresentam cor vermelha, e a nadadeira caudal apresenta uma faixa mediana bem escura. Em ambientes naturais, a fêmea atinge o comprimento de 80 cm e 8,2 kg de peso, enquanto o macho atinge 68 cm e 3,6 kg (Vaz et al., 2000).

Prefere ambientes sombreados em águas claras, sendo encontrada nos locais em que as árvores se deitam sobre o rio, onde obtém os frutos que lhe

servem de alimento. É uma espécie onívora, podendo se alimentar de plantas, pequenos peixes e insetos, em ambientes naturais (Vaz et al., 2000).

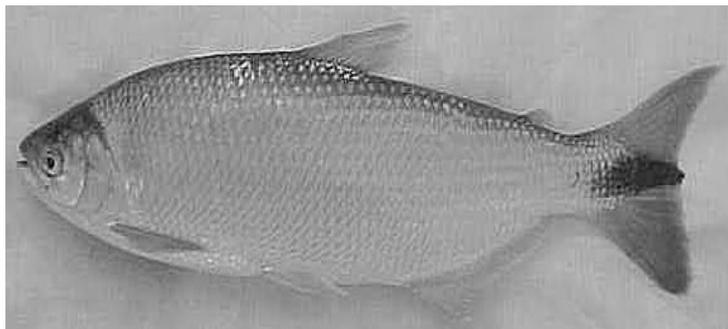


FIGURA 1. Exemplar adulto de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)

Prejuízos ao meio ambiente, como a destruição das matas ciliares, pesca predatória e atividade pesqueira estritamente extrativista, descarga de dejetos nos rios, má utilização dos solos, o represamento dos rios, entre outros, têm ocasionado o desaparecimento dessa espécie de peixe, incluindo-a nas listas de animais ameaçados de extinção (Vaz et al., 2000). Por ser uma espécie de piracema (reofílica), é muito prejudicada pela construção de usinas hidrelétricas nos rios onde habita em diversas fases importantes da sua vida; uma destas fases é a reprodução, que vai garantir a perpetuação dessas espécies no ambiente. As barragens constituem barreira intransponível na sua rota migratória, reduzindo ou eliminando sua eficiência reprodutiva e o retorno dos alevinos. A piracanjuba realiza migração reprodutiva subindo o rio entre setembro e outubro, culminando com a desova entre novembro e janeiro. A partir desse momento realiza a migração para a alimentação, descendo o rio até a região onde permanece de janeiro a agosto. O macho está apto para a reprodução a partir de

dois anos de idade com 20 cm, e a fêmea, a partir do terceiro ano com 25 cm de comprimento (Vaz et al., 2000).

Além do aspecto ecológico, a piracanjuba apresenta bom potencial zootécnico, do ponto de vista do cultivo, como rápido crescimento e ganho de peso demonstrado em criações experimentais e carne de excelente qualidade (Freato, 2005). A piracanjuba tem despertado grande interesse e é muito indicada como alternativa para o desenvolvimento da piscicultura de águas interiores em diversas regiões brasileiras (Moreira et al., 2001), principalmente porque apresenta carne rosada e saborosa, sendo bastante apreciada e de elevado valor comercial (Godoy, 1986), mas não se reproduz naturalmente em cativeiro.

3.2 **Espermatozóides e sêmen**

Os espermatozóides, em qualquer espécie animal, podem ser morfológicamente caracterizados em duas partes – cabeça e cauda (flagelo), sendo esta última subdividida em peça intermediária, peça principal e peça terminal (Figura 2). Na maioria dos grupos de peixes, falta o acrossoma, que está presente nos espermatozóides, em todos os outros grupos de vertebrados (Nagahama, 1983). Todavia, a carência do acrossoma, na maioria dos teleósteos, é compensada pela presença da micrúpila (Figura 3), um orifício no córion do ovo para a penetração do espermatozóide (Cosson et al., 1999).

As características seminais são bastante variadas entre as espécies e a sua avaliação é de grande importância para o estabelecimento da fertilização artificial. Para a descrição de um perfil espermático, são analisadas características físicas do sêmen (volume, motilidade, vigor e concentração) e, ainda, as características morfológicas dos espermatozóides (Fonseca et al., 1992). É importante o conhecimento desses valores para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (Viveiros, 2005). Valores de volume e concentração

espermática estabelecidos para algumas espécies de peixes nativas são apresentados na Tabela 1.

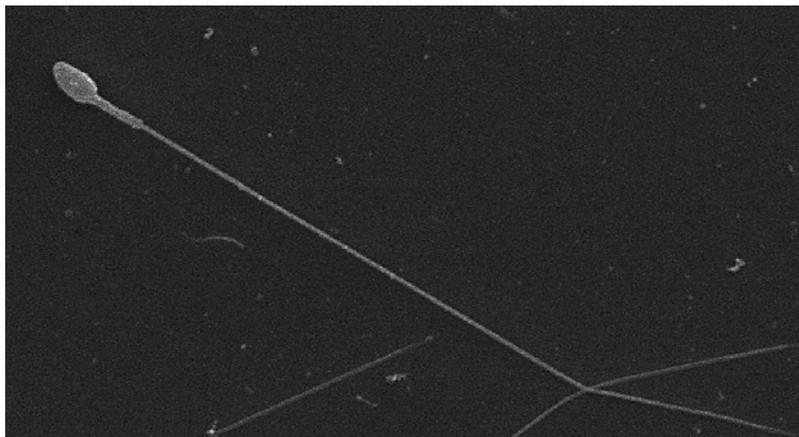


FIGURA 2. Espermatozóide de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*. (Micrografia: Maria, A.N.)

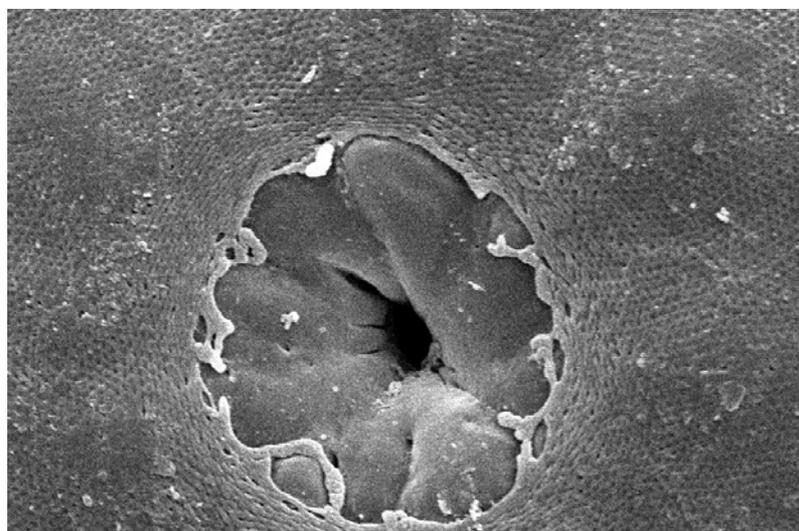


FIGURA 3. Ovócito com presença de micrópila de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*. (Micrografia: Maria, A.N.)

O volume do sêmen e a concentração espermática encontrados nas espécies de peixes são bastante variáveis. É muito variável entre as diversas espécies e dentro de uma mesma espécie, devido à estação do ano, ao clima, ao período de repouso sexual e ao método de coleta. O tamanho dos reprodutores, via de regra, está intimamente relacionado ao volume de sêmen obtido numa coleta (Shimoda, 1999).

TABELA 1 – Volume e concentração espermática do sêmen de algumas espécies brasileiras de água doce

Nome comum e espécie	Volume (mL)	Concentração espermática*	Autores
Curimatã-pacu (<i>Prochilodus marginatus</i>)	ND	19,2 a 26,6	Godinho & Cóser (1995)
		8,6 a 28,7	Shimoda et al. (1997)
Curimbatá (<i>Prochilodus scrofa</i>)	ND	13,3 a 20,5	Godinho & Cóser (1995)
Curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>)	0,5 a 3,0	14,4 a 20,3	Cruz (2001)
		13,3 a 20,5	Godinho & Cóser (1995)
		14,1 a 20,3	Ribeiro (2001)
Dourado (<i>Salminus maxillosus</i>)	ND	4,3 a 10,8	Godinho & Cóser (1995); Oliveira (2006)
Matrinxã (<i>Brycon cephalus</i>)	4,0	9,6	Silveira (2000)
Pacu-caranha (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	7,2 a 4,6	± 7,1 a 11,1	Godinho & Cóser (1995)
		36,6 a 48,1	Bedore (1999)
		31,7 a 43,1	Shimoda (1999)
Piapara (<i>Leporinus elongatus</i>)	ND	7,0 -16,0	Godinho & Cóser (1995)
Piau-açu (<i>Leporinus macrocephalus</i>)	0,05-0,2	3,5 a 7,6	Oliveira et al. (2004)
		11,2 ± 2,8	Ribeiro (2001)
Pintado (<i>Pseudoplatystoma coruscans</i>)	ND	8,0 a 16,0	Godinho & Cóser (1995)
Piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>)	14,5	10,0 a 14,0	Bedore (1999)
	10 a 20	3,9 a 6,1	Oliveira et al. (2004)
	> 15	2,8 a 10,7	Maria (2005)
Pirapitinga (<i>Brycon nattereri</i>)	7,6 a 1,1	± 30,0 ± 5,6	Oliveira (2006)

* espermatozoides x 10⁹/ mL; ND – não descrito. Adaptado de Viveiros (2005).

A concentração, ou densidade, espermática expressa a quantidade de espermatozoides por volume de sêmen, podendo ser determinada por meio de contagem em câmaras volumétricas, mediante diluição do esperma. Valores de concentração, assim como suas variações de acordo com o peso e idade do peixe, época do ano, frequência de coleta e porção do ejaculado, foram estudados por diversos autores. O método mais comum para a determinação da concentração espermática (células espermática/mL de sêmen) é a contagem de espermatozoides, por meio de uma câmara hematimétrica (Buyukhatipoglu & Holtz, 1984). Métodos alternativos têm sido propostos, podendo-se citar a espectrofotometria (Ciereszko & Dabrowski, 1993; Silveira et al., 1987;) e o espermatócrito (Poole & Dillani, 1998; Ribeiro, 2001; Viveiros et al, 2003).

A concentração espermática pode ser estimada em número de espermatozói-de/mL de sêmen, número de espermatozói-de/kg de peso corporal e número de espermatozói-de/peixe. O número de espermatozoides por mL de sêmen é mais apropriado, podendo ser complementado pelo volume total de sêmen (Maria, 2005). Com relação à motilidade espermática, todas as observações sobre motilidade e estudos bioquímicos relatados são realizadas mediante diluição do sêmen. Uma vez que a duração da motilidade é curta (1-2 minutos para os espermatozoides da maioria das espécies de peixes) e visto que o movimento espermático varia durante a fase de motilidade, a diluição é uma peça chave para a determinação da dinâmica de ativação (Billard & Cosson, 1992). A osmolalidade, ou a pressão osmótica tem influência sobre a motilidade espermática, sendo a ativação dos espermatozoides parcial ou totalmente dependente de iso ou hipotonicidade da solução diluente em relação ao plasma seminal (Shimoda, 1999).

A motilidade espermática em peixes é iniciada quando os espermatozoides (que são imóveis no fluido seminal) são liberados no exterior e entram em contato com a água. A diferença existente entre a baixa osmolaridade

da água em relação àquela do plasma seminal é essencial para a iniciação da motilidade dos espermatozoides em peixes de água doce. Nos peixes marinhos, a situação é inversa: a motilidade é iniciada quando o espermatozoide entra em contato com a água do mar, cuja osmolaridade é muito mais elevada que a do plasma seminal (Takai & Morisawa, 1995). Uma completa ativação da motilidade pode ser obtida pela diluição em meio com um milimolar de cálcio (Billard & Cosson, 1992). A iniciação da motilidade é instantânea e dependente da concentração iônica do cálcio, com 50% de completo efeito obtido a, aproximadamente, 1 mM Ca^{+2} . A energia para a motilidade e o metabolismo básico do espermatozoide é derivada de uma quebra de nutrientes exógenos e endógenos, na presença ou ausência de oxigênio (Stoss, 1983).

A diminuição da capacidade de natação dos espermatozoides é originada, em parte, pela diminuição do estoque de energia ocorrida durante o período de motilidade (Billard, 1990; Cosson et al., 1999). Em espermatozoide de peixes, a fosforilização oxidativa mitocondrial, que é altamente requerida para produzir energia durante a locomoção, permanece insuficiente para sustentar o armazenamento de ATP endógeno (Cosson et al., 1999).

3.3 **Influência do pH do plasma seminal**

O pH tem sido descrito como um dos maiores fatores ativadores de sêmen de diversas espécies de peixe (Alavi & Cosson, 2005). Em alguns casos, tem sido relatado o seu efeito sobre capacidade fertilizante do sêmen, como nos resultados de Cho et al. (1992) e de Saad & Billard (1987), que estudaram o efeito do pH sobre a capacidade fertilizante em *Ciprinus carpio* e *Epinephelus malabaricus*, respectivamente. Soluções diluidoras não induziram motilidade em espermatozoides de truta arco-íris quando o pH foi ajustado a valores abaixo de 7,8 (Baynes et al., 1981). Estudos feitos por Baynes et al. (1981) e por Billard & Cosson (1988; 1989; 1992) indicam que íons Ca^{2+} e Mg^{2+} podem superar o

efeito inibitório do pH. Ao contrário, condições alcalinas, isto é, pH similar ou maior que aqueles do plasma seminal, aparentemente, melhoram a motilidade espermática e a habilidade fertilizante dos espermatozóides salmonídeos (Billard 1981; Billard *et al.*, 1974). O pH do plasma seminal mensurado para salmonídeos ficou entre 7,5 a 8,5. Esses resultados demonstram que existe uma correlação significativa entre pH do plasma seminal e a motilidade espermática ou taxas de fertilização (Alavi & Cosson, 2005). Billard (1986) e Gatti *et al.* (1990) relataram que o pH interno dos espermatozóides varia em paralelo com o pH externo e que aquele é cerca de 1 unidade pH abaixo deste. O pH, provavelmente, influencia a concentração protônica intracelular, a qual, subseqüentemente, afeta o potencial de membrana, bem como o comportamento da motilidade (Boitano e Omoto, 1992). Billard & Cosson (1988) relataram que motilidade espermática ótima da truta arco-íris *Parasalmo gairdneri* é em pH 9, quando a temperatura está entre 5°C-21°C.

Em ciprinídeos, tem sido demonstrado que pH intra e extracelular, bem como a concentração iônica da solução ativadora, influencia a ativação e a duração da motilidade espermática (Marian *et al.*, 1997). Lahnsteiner *et al.* (1998) relataram uma correlação significativa entre o pH do plasma seminal e a percentagem de espermatozóides potencialmente móveis, a percentagem de espermatozóides com motilidade linear e a velocidade de natação. Esses resultados sugerem que o pH pode ser uma característica importante do plasma seminal influenciando o potencial para motilidade em espermatozóides de ciprinídeos (Alavi & Cosson, 2005).

3.4 **Preservação do sêmen por meio do resfriamento**

A preservação de gametas de peixes por meio do resfriamento tem sido estudada em algumas espécies de peixes tropicais com resultados satisfatórios. Os espermatozóides de peixes são imóveis no plasma seminal. Esta

característica favorece sua preservação a curto prazo, já que eles não requerem energia para locomoção. Segundo Carolsfeld & Harvey (1999), uma solução diluidora deve ser utilizada no processo de resfriamento, pois a diluição diminui a competição dos espermatozoides por oxigênio e espaço. O resfriamento é uma técnica simples, que permite que o sêmen esteja disponível por intervalo de tempo maior, para a fertilização de ovócitos liberados por fêmeas hormônio-induzidas, o que assegura maior produtividade no processo reprodutivo. Por facilitar o uso de um grande número de machos por fêmea, pode ajudar no progresso do melhoramento genético da prole resultante (Marques & Godinho, 2004).

No Brasil, ainda são poucas as publicações envolvendo o resfriamento de sêmen de espécies nativas. O sêmen de *Brycon lundii* ou matrinxã, *Piaractus mesopotamicus* ou pacu, *Leporinus frederici* ou curimatá/piau-três-pintas, *Leporinus elongatus* ou piapara, *Prochilodus marggravii* ou curimatã-pacu, *Pseudoplatystoma coruscans* ou surubim/pintado e *Brycon orbignyanus* ou piracanjuba foi resfriado por 6-29 horas, apresentando motilidade espermática acima de 30% (Marques, 2001). O sêmen de piracanjuba foi resfriado por até 7 dias, apresentando motilidade espermática em torno de 40% (Maria, 2005); o de *Salminus maxillosus* ou dourado foi resfriado por até 72 horas, com motilidade de 30% e de *Brycon nattereri* ou pirapitinga foi resfriado com sucesso por 7 dias, com motilidade de 70% (Oliveira, 2006).

Contudo, o armazenamento prolongado, em condições de resfriamento, pode afetar profundamente a qualidade das células espermáticas, uma vez que condições anaeróbicas associadas à contaminação microbiana reduzem a motilidade e a viabilidade espermáticas (Rurangwa et al., 2004). Segundo Stoss & Donaldson (1982), os fatores mais determinantes do sucesso do resfriamento são redução da temperatura, fornecimento e troca de gases, prevenção do desenvolvimento bacteriano e prevenção da dessecação.

3.5 Contaminação do sêmen por microrganismos e sua prevenção

Com a coleta e transporte de gametas de espécies aquáticas, existe um risco potencial de transferência microbiana (bactérias, fungos, micoplasmas, etc.). A contaminação do sêmen pode ocorrer durante a coleta, o processamento, o armazenamento e o transporte (Jenkins, 2000a). Um programa bem planejado de preservação de sêmen de espécies aquáticas deve incorporar uma compreensível estratégia para coleta e armazenamento de gametas de alta qualidade, livre de contaminantes patogênicos (Tab 2). Pelo fato de a presença de microrganismos em sêmen coletado e armazenado para uso em fertilização artificial constituir um risco potencial de transmissão de doenças, minimizar essas ameaças é um alvo de um programa de preservação bem sucedido (Jenkins, 2000b). A qualidade do sêmen pode ser afetada pela saúde do doador (AFS Fish Health Section, 1997), por técnicas de coleta e pelo método de manuseio das amostras. O sêmen coletado deve estar livre de água, sangue, muco ou material fecal (Jenkins, 2000a). Restrição alimentar anterior à coleta de sêmen tem sido sugerida (Rana, 1995; Saad et al., 1988). As soluções diluidoras devem ser armazenadas a 4°C-5°C e serem usadas dentro de uma semana (Rana, 1995) ou congeladas a -20°C ou, preferivelmente, a temperaturas mais baixas. Uma checagem deve ser feita anteriormente ao uso, para que o esperma não seja ativado pelo diluente (Jenkins & Tiersch, 1997). O diluente deve ser esterilizado por filtro de esterilização (membranas 0,1 µm) ou autoclavado.

TABELA 2 Alguns microrganismos detectados em sêmen de diferentes espécies de animais

Microrganismos	Animal hospedeiro	Referência
Micoplasmas		
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	Peru	Ferrier et al. 1982
<i>M. bovis</i>	Bovino	Shin et al. 1986
<i>M. bovigenitalium</i>	Bovino	Shin et al. 1986
<i>Ureaplasma</i> spp.	Bovino	Shin et al. 1986
	Peru	Stipkovits et al. 1978
	Bovino	Truscott e Huhnke 1984
Bactérias		
<i>Escherichia coli</i>	Garanhão/galos	Jasko et al., 1993; Sexton et al., 1980
	Suínos	Thacker et al., 1984
<i>Streptococcus</i> spp. β -hemolíticos	Garanhão/galos	Jasko et al., 1993; Sexton et al., 1980,
	Suínos	Thacker et al., 1984
<i>Alcaligenes</i> spp.	Galos	Sexton et al., 1980
<i>Bacillus</i> spp.	Galos/suínos	Sexton et al., 1980, Thacker et al., 1984
<i>Staphylococcus aureus</i>	Galos e suínos	Sexton et al., 1980, Thacker et al., 1984
<i>Proteus</i> spp.	Galos/suínos	Sexton et al., 1980, Thacker et al., 1984
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Garanhão	Jasko et al., 1993
<i>Enterobacter</i> spp.	Suínos	Thacker et al., 1984
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Garanhão/bovinos	Getty e Ellis, 1967; Jasko et al., 1993, Eaglesome e Garcia 1995
<i>Pseudomonas</i> spp.	Peixes (bagre-do-canal)	Jenkins & Tiersch, 1997
<i>Aeromonas</i> sp.	Peixes (bagre-do-canal)	Jenkins & Tiersch, 1997
<i>Klebsiella</i> sp.	Peixes (bagre-do-canal)	Jenkins & Tiersch, 1997
<i>Pantoea</i> sp.	Peixes (bagre-do-canal)	Jenkins & Tiersch, 1997
	Suínos	Thacker et al., 1984
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>Venerealis</i>	Touros	Van Camp et al., 1992; Shin et al., 1986
<i>Leptospira</i> spp.	Suínos e touros	Thacker et al., 1984

Adaptado de Jenkins (2000b)

Antibióticos em forma de pó devem ser dissolvidos em água destilada estéril. Não deve haver adição indiscriminada de antibióticos e aqueles adicionados devem providenciar uma atividade de amplo espectro.

3.6 **Uso de antibióticos nos diluidores de sêmen resfriado**

O uso de antibióticos acrescentados aos componentes dos diluidores de sêmen tem sido prática comum nos protocolos de resfriamento de diversas espécies de interesse produtivo. O interesse crescente pela inseminação artificial tem levado os pesquisadores a estudarem técnicas que viabilizem a conservação de sêmen por longos períodos sem comprometer, no entanto, a sua capacidade de fertilização.

A redução da motilidade e os danos no acrossoma da célula espermática de mamíferos podem ser observados, em decorrência do crescimento bacteriano, no meio diluidor do sêmen (Zagorski et al., 1972). Por este motivo, o uso de antibióticos (ATBs) nos meios diluidores tem sido uma prática muito utilizada, possibilitando o aumento do tempo de estocagem do ejaculado (Poolperm et al., 1998) principalmente de suínos, eqüinos, bovinos e no homem.

Em suínos, a gentamicina é um dos antibióticos mais empregados no controle do desenvolvimento bacteriano no sêmen durante o período de armazenamento *in vitro* (Sone, 1992), havendo, já, diluidores comerciais que trazem este antibiótico em sua composição. Como exemplo podem ser citados o *Beltsville Thawing Solution*, ou BTS[®] (Minitub), que contém sulfato de gentamicina 0,25% e o M III[®] 6% - Merck III (Minitub,) que contém sulfato de gentamicina 0,3%.

No entanto, a aplicação dos antibióticos não tem sido sistematicamente investigada para o uso em espécies aquáticas (Jenkins, 2000b). Alguns autores têm testado a adição de antibióticos ao diluidores para resfriamento com resultados promissores. Em experimentos conduzidos por Christensen & Tiersch

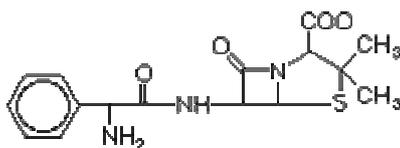
(1996), a adição de 1% de um coquetel de antibióticos comercial ao diluidor, usado em algumas amostras de sêmen de bagre do canal *Ictalurus punctatus*, prolongou o tempo antes que a diminuição da motilidade fosse observada e prolongou o tempo total de armazenamento do sêmen refrigerado. A adição de antimicrobianos na concentração adequada pode prolongar o período de armazenamento de sêmen resfriado por inibir a contaminação bacteriana do sêmen e minimizar a produção de toxinas bacterianas, as quais podem danificar os espermatozoides (Jenkins, 2000b). Segovia et al. (2002), utilizando concentrações de gentamicina de 0,75 mg/mL e ampicilina acima de 0,25 mg/mL, respectivamente, observaram redução significativa sobre a viabilidade espermática e a função mitocondrial em sêmen de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. Entretanto, concentrações de 0,5 mg/mL de gentamicina no sêmen tiveram resultados de viabilidade e função mitocondrial superiores ao controle sem gentamicina. Dados sobre uso de antibióticos nos diluidores de sêmen das espécies de peixes brasileiras são escassos. Maria et al. (2006) utilizaram uma concentração de 0,250 mg/mL de gentamicina associada aos protocolos de alguns diluidores, além de BTS 5%[®] e M III 6%[®] para resfriamento de sêmen de piracanjuba. No entanto, estes mesmos autores não obtiveram resultados significativos com relação a um maior período de armazenamento do sêmen e melhores percentagens de motilidade espermática em relação aos diluidores sem antibiótico.

3.7 Exemplos de antibióticos utilizados em diluidores de sêmen

Vários são os antibióticos utilizados em diluidores de sêmen. Recentemente, alguns trabalhos testaram o uso de antibióticos em sêmen de peixe, entre eles, penicilina e estreptomicina (Christensen & Tiersch, 1996; Segovia et al., 2000), ampicilina (Segovia et al., 2000) e gentamicina (Segovia et al., 2000; Maria et al 2006). Um antibiótico comum a diluidores de sêmen, mas

ainda não testado em sêmen de peixe, é a lincomicina. O uso de lincomicina, penicilina, estreptomicina e gentamicina têm sido exigido em protocolos de resfriamento e congelamento de sêmen em bovinos e requerida nos meios de criopreservação para a comercialização e distribuição de gametas bovinos e bubalinos (Instrução Normativa n° 48, 2003).

A penicilina é um antibiótico natural derivado de um fungo *Penicillium chrysogenum* (ou *P. notatum*), descoberta por Alexander Flemming em 1929 e está disponível como fármaco desde 1941. As penicilinas contêm um anel beta-lactam, assim como as cefalosporinas. Todos os antibióticos beta-lactâmicos interferem na síntese da parede celular bacteriana. A penicilina acopla num receptor dessa parede e interfere na transpeptidação que ancora o peptidoglicano estrutural de forma rígida em volta da bactéria. Como o interior desta é hiperosmótico, sem uma parede rígida há afluxo de água do exterior e a bactéria morre (Wikipedia - Penicilina, 2006b). Existem muitos antibióticos derivados por métodos químicos industriais da penicilina, constituindo as penicilinas semi-sintéticas como, por exemplo, a ampicilina (Figura 4). Estas penicilinas semi-sintéticas possuem maior espectro de ação e são eficazes contra mais microrganismos (Wikipedia - Ampicilina, 2006a).



Ampicilina

FIGURA 4. Estrutura molecular da ampicilina
Fonte: FÁRMACO Web (2006)

Em 1944, o russo Selman A Waksman, estudando alguns fungos do solo, especialmente o *Streptomyces gryseus*, observou que este microrganismo possuía propriedades bactericidas. Com base neste fungo, o cientista desenvolveu o primeiro aminoglicosídeo da história: a estreptomicina, pelo que recebeu, em 1954, o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina. Em 1963, o mesmo pesquisador isolou a gentamicina a partir da *Micromonospora* sp., um dos fármacos da família dos aminoglicosídeos mais utilizados.

Os aminoglicosídeos são antibióticos obtidos do cultivo de *Streptomyces* ou *Micromonospora*. Estes antibióticos contêm 1-2 aminoaçúcares glicosilados unidos a um núcleo central de hexose. A estreptidina é o núcleo da estreptomicina e a 2-deoxiestreptamina (Figura 4) é o núcleo central encontrado na gentamicina (Chambers e Sande, 1997). Com relação a sua estrutura, é importante ressaltar que são antibióticos hidrofílicos (polares) nos quais têm algumas implicações, como: têm má absorção entérica, má penetração pela barreira hematoencefálica e, por seu caráter polar, têm má penetração em membranas biológicas (Figura 4) (Chambers e Sande, 1997).

Inicialmente, acreditava-se que sua ação bactericida consistia, unicamente, de sua união à subunidade 30S do ribossoma bacteriano de forma irreversível, alterando a síntese protéica bacteriana (Chambers e Sande, 1997). Porém, estudos mais aprofundados demonstraram que os aminoglicosídeos possuem moléculas catiônicas que se unem à membrana externa bacteriana e produzem fissuras na mesma, produzindo alguns efeitos. Aumentam a captação da droga pela bactéria e favorecem a saída de conteúdo celular e, portanto, sua morte. A administração de aminoglicosídeos combinados a antibióticos inibidores da síntese de parede celular bacteriana facilita sua entrada na célula (Fármaco Web).

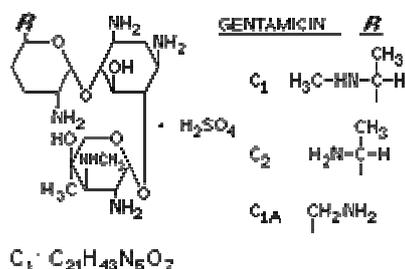


FIGURA 5. Estrutura molecular da gentamicina. Fonte: FÁRMACO WEB (2006)

Os aminoglicosídeos são ativos *in vitro* contra um grande número de bactérias, especialmente bacilos gram-negativos, alguns cocos gram-positivos e algumas micobactérias (Fármaco Web). Com relação ao seu mecanismo de ação, pode-se concluir que são bactericidas, atuam em âmbito intracelular e sobre a membrana celular externa. O efeito bactericida depende da concentração: quanto maior a concentração, maior o efeito bactericida. Um efeito pós-antibiótico, ou seja, a persistência de atividade bactericida após a concentração sérica ter caído abaixo da concentração inibitória mínima, também é característico da gentamicina e a duração desse efeito depende da concentração (Chambers e Sande, 1997).

A lincomicina, como todo antibiótico da classe dos macrolídeos, é similar em estrutura e atividade e interfere na síntese de proteína por ligação reversível à subunidade 50S do ribossomo. Os macrolídeos parecem ligar-se ao sítio doador, e assim previnem a translocação necessária para manter o crescimento da cadeia de peptídeos. Macrolídeos são, por isso, considerados bacteriostáticos e são significativamente mais ativos em faixas de pH elevadas (7,8-8) (Merck, 2006).

Resistência aos macrolídeos em organismos gram-positivos resulta de alterações na estrutura ribossomal e perda da afinidade do macrolídeo. A resistência pode ser intrínseca ou mediada por plasmídeo e constitutiva ou

induzível. Microrganismos gram-negativos são resistentes, provavelmente, devido ao fato de os macrolídeos não penetrarem em suas paredes celulares (Merck, 2006).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFS FISH HEALTH SECTION. **Bluebook**: suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 1997.

ALAVI, S. M. H.; COSSON, J. Sperm motility in fishes: (I) effects of temperature and pH. **Cell Biology International**, London, v. 29, n. 2, p. 101-110, Feb. 2005a.

BEDORE, A. G. **Caracterização e criopreservação do sêmen de pacu-caranha *Piaractus mesopotamicus* e de piracanjuba *Brycon orbignyanus***. 1999. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BAYNES, S. M.; SCOTT, A. P.; DAWSON, A. P. Rainbow trout, *Salmo gairdneri*, spermatozoa: Effects of cations and pH on motility. **Journal of Fish Biology**, London, v. 19, n. 3, p. 259-267, 1981.

BILLARD, R. Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G. E. (Org.). **Marshall's physiology of reproduction**. 4. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990. Chap. 9, p. 870-887.

BILLARD, R. Short- term preservation of sperm under oxygen atmosphere in Rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 23, n. 1/4, p.287-293, 1981.

BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 26, n. 4, p. 877-920, 1986.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Measurement of sperm motility in trout and carp. In: De PAUW, N.; JASPER, E.; ACKEFORS, H.; WILKINS, N. (Ed.). **Aquaculture, a biotechnology in progress**. Bredene, Belgium: European Aquaculture Society, 1989. p. 499-503

BILLARD, R.; COSSON, M.P. Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 261, n. 2, p. 122-131, Feb. 1992.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Sperm motility in Rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*; Effects of pH and temperature. In: BRETON, B.; ZOHAR, Y. (Ed.).

Reproduction in fish basic and applied aspects in endocrinology and genetics. Paris: INRA, 1988. p. 161-167.

BILLARD, R.; PETIT, J.; JALABERT, B.; SZOLLOSI, D. Artificial insemination in trout using a sperm diluent. In: BLAXTER, O. H. S. (Ed.). **Symposium on the early life history of fish.** Berlin: Springer-Verlag, 1974. P. 715-723.

BOITANO, S.; OMOTO, C. K. **Trout sperm swimming patterns:** role of intracellular Ca²⁺. **Cell Motil Cytoskeleton**, St. Paul, v. 21, p. 74-82, 1992.

Brasil. Instrução Normativa 48, de 17 de junho de 2003. Estabelece que somente pode ser distribuído no Brasil o sêmen bovino ou bubalino coletado em centros de coleta e processamento de sêmen – CCPS, registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, que cumprem os requisitos sanitários mínimos para produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no país. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 6, 20 de junho de 2003. Seção 1.

BUYUKHATIPOGLU, S.; HOLTZ, W. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 63-71, 1984.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. **Conservação de recursos genéticos de peixes:** teoria e prática. Tradução de H. P. Godinho. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust, 1999. 47 p. (Curso de treinamento brasileiro).

CHAMBERS, H. F.; SANDE, M. A. Fármacos antimicrobianos – os aminoglicosídeos. In: GILMAN, A. G.; RUDDON, R. W.; MOLINOFF, P. B. LIMBIRD, L. E.; HARDMAN, J. G. **Goodman e Gilman – as bases da farmacológicas da terapêutica.** 9.ed. São Paulo: Mc Graw Hill, 1997. c. 46, p. 813-823.

CHAO, N. H.; TSAI, H. P.; LIAO, I. C. Short-term and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabracius* (Bloch & Schneider). **Asian Fish Science**, n. 5, p. 3-16, 1992.

CHRISTENSEN, J. M.; TIERSCH, T.R. Refrigerated storage of channel catfish sperm. **Journal of World Aquaculture Society**, Baton rouge, v. 27, n. 3, p. 340-345, Sept. 1996.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 109, n. 3/4, p. 367-373, Feb. 1993.

COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DRÉANNO, C.; SUQUET, M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.). **The male gamete: from basis in science to clinical applications**. Viena: Cache River Press, 1999. c. 16, p. 162-186.

CRUZ, V. L. B. **Criopreservação do sêmen de curimatá (*Prochilodus lineatus*)**. 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M. Comparisons of antibiotic combinations to control *Pseudomonas aeruginosa* in bovine semen. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 59, n. 1, p. 73-75, Jan. 1995.

FARMACO WEB – Aminoglicósidos: Aplicaciones prácticas. Pontifícia Universidad Javeriana, Faculdade de Medicina. Sessão desenvolvida pela Dra Yadira Sanchez, 2000. Sessão Fisiologia. Apresenta informações sobre farmacologia. Disponível em:
<<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/index.htm>>. Acesso em: 9 jul. 2006.

FARMACO WEB – Penicilinas, Cefalosporinas y otros Betalactâmicos. Pontifícia Universidad Javeriana, Faculdade de Medicina. Sessão desenvolvida pela Dra Yadira Sanchez, 2000. Sessão Fisiologia. Apresenta informações sobre farmacologia. Disponível em:
<<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/index.htm>>. Acesso em: 9 jul. 2006.

FERRIER, W. T.; ORTMAYER, H. B.; OGASAWARA, F. X.; ZAMANOTO, R. The survivability of *Mycoplasma meleagridis* in frozen-thawed turkey semen. **Poultry Science**, v. 6, p. 379-381, 1982.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância (SISVAR)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1999. ver. 4. 3 (Build 43).

FONSECA, V. O.; VALLE FILHO, F. R.; ABREU, J. J.; MIES FILHO, A. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 1992. 69 p.

FREATO, T. A **Morfometria, rendimento no processamento e inter-relações na avaliação de carcaça de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849)**. 2005. 102 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GATTI, J. L.; BILLARD, R.; CHRISTEN, R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: role in the initiation of motility. **Journal of Cell Physiology**, New York, v. 143, n. 3, p. 546-544, June 1990.

GETTY, S.; ELLIS, D. J Experimental use of bull semen contaminated with *Pseudomonas aeruginosa* organisms **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg v. 150, n. 11, p. 130-138, 1967.

GODINHO, H. P.; CÓSER, A. M. L. Bases morfofuncionais da espermatogênese e criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 16-25.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**. Piracicaba: Editora Franciscana, 1975. 309 p.

GODOY, M. P. **Peixes e pesca do Rio Paraná: área do futuro reservatório de Ilha Grande**. Florianópolis: ELETROSUL, 1986.

GOPALKRISHNAN, K.; JOSEPH, R.; SHETH, A. R. Alteration of semen characteristics and regulatory factors in human semen with bacterial infection. **Archives of Andrology**, Bristol, v. 32, n. 3, p. 213-218, May/June 1994.

JASCO, D. J.; BEDFORD, S. J.; COOK, N. L.; MUMFORD, E. L.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 40, p. 885-893, 1993

JENKINS, J.A. Minimizing microbial contamination of sperm samples In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Ed.). **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 2000a. p. 276-279.

JENKINS, J. A. Infections disease and quality assurance considerations for the

transfer of cryopreserved fish gametes. In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.) **Criopreservation in aquatic species**. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 2000b. p. 276-279.

JENKINS, J. A.; TIERSCH, T. R. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. **Journal World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 28, n. 3, p. 282-288, Sept. 1997.

KAHN, C. M.; LINE, S.; AIELLO, S. E. (Ed.) The merck veterinary manual web site. Sessão Drogas Antimicrobianas – Classes. Apresenta informações referentes as classes de antibióticos e seus principais fármacos. 9. ed. Macrolide. Merck/Merial, 006. Disponível em: <<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp>>. Acesso em: 13 set. 2006.

LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Determination of semen quality of the rainbow trout by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoal metabolism. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 163, n. 1/2, p. 163-181, Apr. 1998.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, in press.

MARIAN, T.; KRASZNAI, Z.; BALKAY, L.; BALAZS, M.; EMRI, M.; BENE, L.; TRON, L. Hypo-osmotic shock inducing osmolality dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, New York, v. 41, n. 2, p.291-298, Feb. 1993.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 799-804, Sept. 2004.

MOREIRA, A. B.; VISENTAINER, J. V.; DE SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Fatty acids profile and cholesterol contents of three brazilian *Brycon* Freshwater Fishes. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 14, p. 565-574, Nov./dez. 2001.

NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish Physiology**. New York: Academic Press, 1983. v. 9, p. 233-275.

OLIVEIRA, A. V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, A. V.; VIVERIOS, A. T. M.; MORAES, G. F.; MARIA, A. N.; ÓRFÃO L. H.; SOUZA, G. A. Estudo comparativo das características seminais e de soluções diluidoras de sêmen durante o resfriamento, de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 13., 2004, Lavras **Anais...** Lavras: UFLA, 2004.

POOLE, W. R.; DILLANE, M. G. Estimation of sperm concentration of wild and reconditioned brown trout, *Salmo trout* L. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 439-445, June 1998.

POOLPERM, P.; FLOWERS, W. L.; ALMOND, G. W. Evaluation of antibiotics in boar semen extender. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham, Inglaterra, **Proceedings....** Birmingham, Inglaterra, 1998.

RANA, K. J. Cryopreservation of fish spermatozoa. In: DAY, J. G.; McLELLAN, M. R. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New Jersey: Humana Press, 1995. p. 151-165.

RIBEIRO, R. I. M. A. **Criopreservação do sêmen do piau-açu *Leporinus macrocephalus* (Garavello e Britski, 1998)**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

RURANGWA, E.; KIME, D. E.; OLLEVIER, F.; NASH, J. P. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Review article. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 1-28, May 2004.

SAAD, A.; BILLARD, R. Spermatozoa production and volum of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.65, n .1, p. 67-77, 1987.

SAAD, A.; BILLARD, R.; THERON, M. C.; HOLLEBECQ, M. G. Short-term preservation of carp *Cyprinus carpio* semen. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 71, n. 1/2, p. 133-150, June 1988.

SEXTON, T. J.; JACOBS, L. A.; McDANIEL, G. R. A new poultry semen extender. 4. Effect of antibacterials in control of bacterial contamination in chicken semen. **Poultry Science**, Champaign, v. 59, n. 2, p. 274-281, Feb. 1980 .

SHIMODA, E. **Caracterização física, química e microscópica do sêmen do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 1999. 61 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, R. J.

SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R.; VIDAL JÚNIOR, M. V.; SLIVA, J. F. S.; CARBALLO, O. W. F.; CRUZ, G. M. Influência da presença da fêmea sobre as características seminais do curimatá (*Prochilodus marggravii* Walbaum. 1972). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 4, n. 1, p. 39-42, jan./mar. 1997.

SHIN, S. J.; LEIN, D. H.; PATTEN, V. H. The control of micoplasmas, ureaplasmas, *Campilobacter fetus*, *haemophilus sommus* in frozen bovine semen. In: TECHNICAL CONFERENCE IN ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 11., 1986. Milwaukee, Canada. **Proceeding...** Milwaukee, 1986.

SILVEIRA, A. N. **Caracterização espermática, preservação criogênica do sêmen e fertilidade do matrinxã, (*Brycon cephalus*)**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP.

SILVEIRA, W. F.; KAVAMOTO, E. T.; RIGOLINO, M. G.; TABATA, Y. A. O método espectrofotométrico na avaliação da concentração de espermatozoides na truta arco-íris, *Salmo irideus* Gibbons. **Boletim da Indústria da Pesca**, São Paulo, v. 14, p. 69-73, 1987.

SONE, M.; CHIKYU, M.; YOSHUDA, M.; BAMBA, K.; OGASA, A.
Prolonged storage of boar semen in liquid form. **Journal Swine Science**, v. 29,
p. 41-50, 1992.

STIPKOVITS, L.; RASHWAN, A. SABRY, M. Z. Studies on the
pathogenicity of ureaplasmas in poultry. **Zentralblatt fuer
Veterinarmedizin B**, Berlin, v. 25, n. 9, p. 707-712, Nov. 1978.

STOSS, J. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: HOAR,
W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**.
London: B. Academic Press, 1983. v. 9, cap. 6, p. 305-350.

STOSS, J.; DONALDSON, E. M. Preservation of fish gametes. In:
INTERNATIONAL SYMPOSIUM REPRODUCTION PHYSIOLOGY FISH,
1982, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen, 1982. p. 114-122.

TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K⁺ concentration caused
by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater
teleosts. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 1175-1181, Mar.
1995.

TRUSCOTT, R.B.; RUHNKE, H.L. The effect of antibiotics against
bovine mycoplasmas and ureaplasmas. **Canadian Journal of Comparative
Medicine**, Ottawa, v. 48, n. 2, p. 171-174, Apr. 1984.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de
peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO
BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO.
Palestras... Goiânia, GO, 2005.

WIKIPÉDIA – Ampicilina. Desenvolvido pela Wikimedia Foundation.
Apresenta conteúdo enciclopédico. Disponível em:
<<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Ampicilina&oldid=2173972>>.
Acesso em: 4 Set 2006a

WIKIPÉDIA – Penicilina. Desenvolvido pela Wikimedia Foundation. Apresenta
conteúdo enciclopédico. Disponível em:

<<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Penicilina&oldid=2629813>>. Acesso em: 4 Set 2006b

ZAGORSKI, D.; PAVLOV, A.; TSOICHEVA, P. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1972, Munchen. **Proceedings...** Munchen, 1972, p.313.

CAPÍTULO 2

ISAÚ, Z. A. Efeito do pH, crescimento bacteriano e do uso de gentamicina sobre a motilidade espermática do sêmen de *Brycon orbignyanus*, piracanjuba, durante o resfriamento e o uso de sêmen com gentamicina na fertilização.

In: _____ **População bacteriana, motilidade espermática e fertilidade de sêmen de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849) submetido ao resfriamento.** 2006. 93 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG

Efeito do pH, crescimento bacteriano e do uso de gentamicina sobre a motilidade espermática do sêmen de *Brycon orbignyanus*, piracanjuba, durante o resfriamento e o uso de sêmen com gentamicina na fertilização

1 RESUMO

O resfriamento de sêmen é um método simples de preservação de gametas. No entanto, o crescimento de bactérias e as mudanças no pH do sêmen parecem ser fatores que comprometem a viabilidade espermática nessa técnica. Este estudo teve o objetivo de aperfeiçoar um protocolo de resfriamento de sêmen de *Brycon orbignyanus*, piracanjuba, por meio do controle do pH e de crescimento bacteriano. Em cada experimento, amostras de sêmen foram diluídas (1:10 volume final) em solução de Saad (NaCl 200 mM, Tris 30 mM; Saad et al., 1988) filtradas e armazenadas entre 4°C-6°C. No experimento 1, o pH da solução foi ajustado para 7,0; 7,6; 8,2 e 8,8 e o sêmen diluído em cada solução. A motilidade espermática foi avaliada a cada dia, por 7 dias. No experimento 2, o pH da solução foi ajustado para 7,6 e o sêmen diluído nessa solução foi avaliado a cada dia, quanto à motilidade espermática e o crescimento de bactérias a partir de contagem em placas de Petri (determinação de UFC/mL). No experimento 3, colônias bacterianas isoladas das amostras de sêmen (experimento 2) foram submetidas a teste de sensibilidade *in vitro* (discos de difusão) com 5 antibióticos (penicilina, estreptomicina, lincomicina, ampicilina e gentamicina). Em seguida, a adição de gentamicina em cinco concentrações, 0; 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL, em solução de Saad foi testada para a diluição do sêmen. A motilidade espermática e o crescimento de bactérias (experimento 4), além de uma possível interferência dessas concentrações de gentamicina sobre fertilização de ovócitos (experimento 5) foram determinados. Foi observado que, quando o pH da solução de Saad foi ajustado em 7,6, foram obtidas as maiores

taxas de motilidade espermática em relação às amostras de sêmen diluído em solução com pH ajustado para 7,0; 8,2 e 8,8 e ao sêmen não diluído. No experimento 2, foi observado um aumento progressivo de bactérias no sêmen durante o resfriamento, acompanhado por uma queda gradativa nas taxas de motilidade espermática. Dentre as bactérias isoladas para o teste de sensibilidade, 92,4% foram sensíveis à gentamicina. Amostras de sêmen diluído em solução de Saad contendo gentamicina demonstraram percentual de motilidade maiores que o controle (0 mg/mL gentamicina) entre o 4° e o 6° dias de resfriamento ($P < 0.05$). No sexto dia, foi observado que amostras de sêmen diluído em solução contendo 0,1 mg/mL de gentamicina mantiveram maiores taxas de motilidade em relação ao controle e à amostra diluída em 0,01 mg/mL de gentamicina. No entanto, ao 8° dia, todas as amostras apresentaram taxas de motilidade próximas a zero. Sêmen recém-coletado, diluído em solução de Saad contendo 0,1 mg/ml de gentamicina, também obteve melhor resultado na fertilização dos ovócitos em relação às demais soluções contendo gentamicina. Apesar de não prolongar o período de armazenamento em relação ao controle, os resultados apresentados justificam a utilização da gentamicina na manutenção do material genético livre de contaminantes bacterianos e diminuindo o potencial risco de transferência de microrganismos patogênicos entre plantéis e entre instalações de finalidade diferenciadas.

Palavras chaves: sêmen, resfriamento, bactérias, gentamicina, piracanjuba

Effect of pH, bacterial growth and use of gentamicin on sperm motility of *Brycon orbignyanus* semen under refrigeration and use of semen with gentamicin on oocytes

2 ABSTRACT

Semen refrigeration is a simple method for sperm preservation. However, bacterial growth and changes in pH of the refrigerated semen seem to be factors that decrease sperm viability in this technique. The aim of this study was to improve protocols of refrigerated piracanjuba, *Brycon orbignyanus* semen by pH and bacterial growth controls. Samples of semen were diluted (1:10 total volume) in filtered Saad solution (NaCl 200 mM, Tris 30 mM; Saad et al., 1988) and stored at 4°-6°C. In the first experiment, the pH of the Saad solution was adjusted for 7.0, 7.6, 8.2, 8.8, and the semen diluted in all solutions. The sperm motility was evaluated daily, for 7 days. In the second experiment, samples diluted in Saad solution pH 7.6 and stored at 4-6°C were evaluated, daily, for sperm motility, and every 48h, for bacterial contamination (UFC/mL) by inoculation on tryptcasein soy agar (TSA), for 8 days. In the third experiment, bacterial colonies isolated in the previous experiment were tested, *in vitro*, for sensibility (antibiogram) to five antibiotics (penicillin, streptomycin, lincomycin, ampicillin, and gentamicin). In the fourth experiment, the addition of five gentamicin concentrations – 0, 0.01, 0.1, 0.5 and 1.0 mg/mL – in Saad solution was tested as extenders for semen under refrigeration. Sperm motility and bacterial growth (fourth experiment) and a possible interference of these concentrations on oocytes fertilization (fifth experiment) were determined. It was observed that, when the pH of the Saad solution was adjusted to 7.6, higher sperm motility rates were obtained compared to samples diluted in solutions with pH to 7.0, 8.2 e 8.8 and the non-diluted semen. In the second experiment, a

progressive increase in bacteria number was observed during the refrigeration period, besides a gradual decrease in sperm motility rate. Ninety-two percent of the bacteria selected for the sensibility test were sensible to gentamicin. Semen diluted in Saad solution with gentamicin presented higher motility rates than the control (0 mg/mL gentamicin), between the fourth and sixth days of refrigeration ($P < 0.05$). On the sixth day, samples diluted in solution with gentamicin 0.1 mg/mL maintained greater sperm motility rates compared to the control and samples diluted in 0.01 mg/mL of gentamicin. Nevertheless, all samples presented motility rates close to zero on the eighth day. Fresh semen diluted in Saad solution with gentamicin 0.1mg/mL also presented a better result in oocytes fertilization when compared to the other semen extenders with gentamicin. Although the storage time was not extended, these results justify the use of gentamicin in order to keep the genetic material free of bacterial contamination and decrease the risk of transfer of pathogenic microorganisms between breeders and tanks with different purposes.

Keywords: semen, refrigerated, bacterias, gentamicin, piracanjuba

3 INTRODUÇÃO

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), é uma espécie de teleosteo encontrada nas bacias dos rios Grande, Paranaíba e Paraguai (Godoy, 1975). É uma espécie de peixe migratória e, devido às modificações ambientais provocadas pelo homem, a população dessa espécie está desaparecendo, constando na lista das espécies em extinção em Minas Gerais/Brasil (Vaz, 2000). A piracanjuba também tem demonstrado características satisfatórias para o cultivo, quanto aos seus rendimentos no processamento, quando comparadas a outras espécies cultivadas (Freato, 2005). Para a sua reprodução em cativeiro com finalidade de cultivo ou repovoamento dos rios, é necessário o uso de fertilização artificial.

O resfriamento de sêmen é uma técnica de conservação de gametas por curto período de tempo, simples e útil na fertilização artificial. O sêmen pode ser estocado refrigerado, por um período que varia de poucas horas a dias, dependendo da espécie de peixe, da taxa de diluição e do diluidor utilizado (DeGraaf & Berlinsky, 2004; Rana, 1995). O resfriamento de gametas de espécies aquáticas é útil para inúmeras técnicas, incluindo hibridização (Goudie et al., 1993) e ginogênese (Ihssen et al., 1990), para manter linhagens genéticas, além de ajudar na recuperação de populações em extinção e maximizar a produção da aqüicultura. Métodos para otimizar o armazenamento de sêmen por meio do resfriamento têm sido descritos em diversas espécies, tais como *Oncorhynchus mykiss* ou truta-arco-íris (Billard, 1981), *Oreochromis niloticus* ou tilápia-do-Nilo (Harvey e Kelley, 1988), *Salminus maxillosus* ou dourado, *Brycon nattereri* ou pirapitinga (Oliveira, 2006), *Piaractus mesopotamicus* ou pacu (Marques & Godinho 2004), *Leporinus macrocephalus* ou piau-açu (Moraes, 2004), *Leporinus elongatus* ou piapara (Marques & Godinho, 2004), *Brycon orbignyanus* ou piracanjuba (Marques & Godinho, 2004; Maria et al.,

2006), dentre outros. No entanto, o período de armazenamento do sêmen resfriado parece ser limitado por variações no pH e por crescimento bacteriano, entre outros fatores.

Segundo Boitano e Omoto (1992), o pH, provavelmente, influencia a concentração protônica intracelular, a qual, subseqüentemente, afeta o potencial de membrana, bem como o comportamento da motilidade espermática em peixes.

A presença de bactérias tem sido correlacionada com a diminuição nas taxas de fertilidade de sêmen de *Salmo salar* ou salmão-do-atlântico (Stoss e Refstie, 1983), motilidade e fertilidade de sêmen de *Cyprinus carpio* ou carpa-comum (Saad et al., 1988) e motilidade do sêmen de *Ictalurus punctatus* ou bagre-do-canal (Christensen & Tiersch, 1996). Apesar disso, a contaminação bacteriana do sêmen de peixes tem recebido pouca atenção. Poucos estudos têm se destinado à otimização dos protocolos de armazenamento refrigerado do sêmen de peixe pelo uso de antibióticos e, geralmente, não há análise bacteriológica (Jenkins & Tiersch, 1997).

Além da ameaça de transmissão de doenças, a presença de microrganismos nas amostras de sêmen pode colocar em risco germoplasmas valiosos pela diminuição da capacidade fertilizante e pela perda de qualidade e da viabilidade celular (Jenkins, 2000b). Métodos para prolongar o período de armazenamento de sêmen de piracanjuba por meio do uso de antibiótico foram, inicialmente, descritos numa dissertação (Maria, 2005) e, mais tarde, publicados em forma de artigo, por Maria et al. (2006). Nesse estudo, 0,25 mg de gentamicina foram adicionados em diversos diluidores de sêmen. Após sete dias de armazenamento, entre 4°C-6°C, não foi encontrada nenhuma diferença significativa na motilidade espermática entre as amostras de sêmen diluídas em meio contendo gentamicina ou não. A análise bacteriológica do sêmen, entretanto, não foi realizada.

Este estudo foi realizado com o objetivo de prolongar o período de viabilidade espermática do sêmen durante o armazenamento sob resfriamento. Para tal, foram avaliados o pH do diluidor (experimento 1) e o crescimento bacteriano no sêmen diluído (experimento 2) em relação à motilidade espermática; a susceptibilidade de bactérias isoladas em amostras de sêmen a diferentes antibióticos (experimento 3), e o sêmen diluído em solução de Saad em diferentes concentrações de sulfato de gentamicina em relação à motilidade espermática, ao crescimento bacteriano (experimento 4) e à taxa de fertilização de ovócitos (experimento 5).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos cinco experimentos nos meses de novembro de 2005 a janeiro de 2006, durante o período reprodutivo (piracema), utilizando-se 17 machos de piracanjuba provenientes da estação de piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) em Itutinga, MG.

A espermição foi obtida após indução com extrato de hipófise de carpa (4mg/kg), conforme rotina da estação de piscicultura. O sêmen foi coletado individualmente por meio de leve compressão abdominal e colocado em béquer de vidro limpo (não estéril) e seco. Foi verificada, logo após a coleta, a ausência de água, sangue ou urina no sêmen. Em seguida, o sêmen foi avaliado quanto: à motilidade espermática por meio da ativação com solução de NaCl 50 mM (Maria, 2005) em microscópio de luz; ao potencial hidrogeniônico (pH) (medidor de pH portátil digital, LT Lutron PH – 206) e à concentração espermática determinada por meio de contagem na câmara hematimétrica de Neubauer.

Apenas amostras com motilidade acima de 80% foram usadas neste estudo. O sêmen foi diluído na concentração de 1:10 do volume final em solução de Saad (NaCl 200 mM, Tris 30 mM; Saad et al., 1988), de acordo com

protocolo já estabelecido para piracanjuba (Maria 2005) e filtrada com filtro Millipore® de 0,22 µm. O pH inicial da solução diluidora de Saad foi determinado em torno de 10, o qual foi ajustado de acordo com o experimento 24 horas antes de cada diluição. As amostras de sêmen diluídas foram, então, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e encaminhadas ao Laboratório de Doenças dos Animais Aquáticos (AQUAVET) na Universidade Federal de Lavras, MG, onde foram conduzidos os experimentos.

Experimento 1. Efeito do pH do diluidor

O experimento foi delineado em blocos (3 machos) com parcela subdividida em relação ao tempo, num fatorial 5 x 8 (5 tratamentos – 4 níveis de pH e sêmen não diluído x tempos). Logo após a coleta, o sêmen foi diluído em quatro soluções de Saad que tiveram seus pHs ajustados para 7,0; 7,6; 8,2 e 8,8. Uma quinta amostra de sêmen foi mantida não diluída e utilizada como controle. Todas as amostras, diluídas ou não, foram mantidas em refrigerador em temperatura de 4°C-6°C em tubos de ensaio 15 x 100 mm de vidro abertos. A motilidade espermática e o pH foram avaliados a cada dia, durante 7 dias.

Experimento 2. Correlação entre motilidade espermática e crescimento bacteriano durante o resfriamento

Esse experimento foi delineado em blocos (6 machos) casualizados. O sêmen de cada macho foi individualmente diluído em solução de Saad, com pH ajustado em 7,6 e mantido refrigerado (4°C-6°C), por 8 dias. Diariamente, a motilidade espermática foi determinada e, a cada dois dias, a presença de bactérias foi mensurada. Para quantificar a população bacteriana existente no sêmen, foram utilizados o método de diluição e a semeadura em superfície de ágar (Quinn et al., 1994). Amostras de 500 µL de sêmen diluído em solução de Saad foram rediluídas seriadamente em base 10, variando de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰, em

solução salina estéril (NaCl 0,85%). Alíquotas de 100 µL do sêmen rediluído em concentrações adequadas foram semeadas em duplicata pelo método *spread plate* em placas de Petri contendo ágar soja trypticaseína (TSA) (Biolife, Itália) suplementado com 1.000 UI/ml de Nistatina[®] (Medley, Brasil), para prevenção do crescimento de leveduras (Carneiro, 2005). Após inoculação, as placas foram incubadas a 30^oC, por 24 horas. A quantificação foi feita por contagem de colônias nas diluições adequadas (placas que apresentassem entre 30 e 300 colônias) e determinada as unidades formadoras de colônia por mililitro de sêmen (UFC/mL). Para controle da esterilidade na solução diluidora de Saad, foi realizado, antes da diluição de cada amostra de sêmen, um inóculo da solução pura para se determinar a presença de bactérias no diluidor. Apenas soluções livres de bactérias foram utilizadas para diluir sêmen.

Experimento 3. Seleção de antibióticos

O objetivo deste experimento foi avaliar o perfil de resistência a antibióticos de colônias bacterianas selecionadas a partir do experimento 2, em relação a cinco diferentes antibióticos. Cinquenta e três colônias de bactérias de diferentes morfotipos foram selecionadas e, de cada colônia bacteriana, foi coletada uma porção de massa bacteriana, a qual foi suspensa e homogeneizada em solução salina (NaCl 0,85%). A turbidez da suspensão foi ajustada ao padrão 0,5 da escala de McFarland, para a realização de teste de sensibilidade *in vitro*, pelo método de discos de difusão, utilizando o ágar Müller Hinton (Merck) (NCCLS, 1997). Os discos foram colocados na superfície do ágar, utilizando-se pinças previamente flambadas. Foram utilizados discos de papel de filtro (Cecon, Brasil) contendo doses padronizadas de gentamicina 10 µg, ampicilina 30 µg, penicilina G 10 UI, lincomicina 10 µg e estreptomicina 10 µg. As 53 placas (1 placa por colônia) foram incubadas em estufa bacteriológica, a 30^oC, durante 24 horas. Após este período, os diâmetros dos halos de inibição foram

medidos e comparados com a tabela de performance padrão para os testes de sensibilidade a antibióticos. Cada amostra foi classificada como sensível, intermediária ou resistente.

Experimento 4. Efeito da gentamicina na motilidade espermática, pH e crescimento bacteriano

Este experimento foi delineado em blocos (8 machos), com parcela subdividida, num fatorial 5 x 9 (concentrações x tempos). Foi testada a adição de sulfato de gentamicina (apresentação comercial em pó) em cinco diferentes concentrações (mg/mL de solução de Saad): 0 (controle); 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0. Sêmen de cada macho foi individualmente diluído em cada solução e resfriado por 8 dias. Diariamente, foi avaliada a motilidade espermática e, a cada dois dias, o crescimento bacteriano.

Experimento 5. Efeito da gentamicina na taxa de fertilização do sêmen

Para checar se a adição do sulfato de gentamicina teria efeito negativo sobre os ovócitos ou sobre os eventos da fertilização, o sêmen fresco de dois machos foi diluído nas cinco concentrações de gentamicina empregadas no experimento 4 (0; 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL) e utilizado para fertilizar ovócitos de uma fêmea com duas repetições (2x5x2 = 20 parcelas). Para isso, foi selecionada uma fêmea da mesma espécie, que apresentava abdômen abaulado e liberação de ovócitos sobre leve pressão abdominal. A fêmea recebeu indução hormonal com uma dose inicial de 0,5 mg/kg de extrato de hipófise de carpa e após 12 horas, uma segunda dose de 5,0 mg/kg. Após um período de latência de 8 horas, foram coletados ovócitos, conforme rotina da estação de piscicultura. Para fertilização artificial, foram utilizadas duas alíquotas de 100 µl de cada amostra de sêmen diluído e duas alíquotas de 0,2 mg de ovócitos (4 repetições por tratamento). A primeira e a última porção de ovócitos foram fertilizadas com

sêmen não diluído, para controle da qualidade dos ovócitos (Viveiros et al., 2000). A ativação da motilidade espermática foi feita com 2 ml de água do tanque. Dois minutos após a ativação, os ovos foram hidratados com acréscimo de 10 ml da mesma água, por cinco minutos. Depois, os ovos foram transferidos para incubadoras cilíndricas feitas com tubos de PVC e fundo de tela fina, em tanques com fluxo de água constante, com uma vazão suficiente para movimentar os ovos (Viveiros et al., 2000). A taxa de fertilização foi observada após 8 horas e foi expressa em porcentagem de ovos fecundados em relação ao número total de ovos.

Análise estatística

Os dados de motilidade espermática, variação de pH e crescimento bacteriano (experimentos 1 e 4) foram submetidos à análise de regressão, pelo método de polinômio ortogonal de Fisher e à análise de variância e médias comparadas, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os dados de motilidade espermática e UFC/mL (experimento 2) foram avaliados pela análise de correlação de Pearson e submetidos ao teste de significância T de Student (Excel – Microsoft Corporation, 2000). Para a análise dos dados de crescimento bacteriano, os valores em UFC foram transformados em logaritmo. A taxa de fertilização de ovócitos observada com uso de diferentes concentrações de gentamicina (experimento 5) foi analisada pela análise de regressão. Com exceção do experimento 2, todos os dados foram analisados utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância – Sisvar (Ferreira, 1999).

O modelo estatístico utilizado nos experimentos em blocos com parcela subdividida foi:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + B_j + e_{ij} + P_k + (PD)_{ik} + e_{(ijk)}$$

em que:

Y_{ijk} = variável observada (motilidade, pH, etc) no sêmen que recebeu o tratamento i (pH, gentamicina) no período de estocagem k no bloco j ;

μ = média geral;

D_i = efeito do tratamento i (pH, gentamicina);

B_j = efeito do bloco j ; com $j = 1, 2, 3, \dots, n$ (animais);

e_{ij} = erro associado à parcela que recebeu o tratamento i (pH, gentamicina) no bloco j ;

P_k = efeito do período de estocagem k ; com $k = 0, 48, 96, 144, 192$ h

$(PD)_{ik}$ = efeito da interação entre o tratamento i e o período de estocagem k ;

$e_{(ijk)}$ = erro associado à subparcela que recebeu o tratamento i (pH, gentamicina) no período de estocagem k no bloco j .

A equação de regressão obtida foi dada pela expressão:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 X^1 + b_2 X^2 + \dots + b_i X^i + e_i$$

em que:

\hat{Y} : cada valor observado da variável dependente, $i = 1, 2, \dots, n$;

b_0 : é uma constante referente ao intercepto da reta no eixo Y ;

b_i : coeficientes de regressão parciais;

X^i : representa as concentrações de gentamicina explicativas que constituem o modelo;

e_i : erro associado a cada observação

5 RESULTADOS

Os animais utilizados possuíam peso médio de $1,3 \pm 0,2$ kg. O volume médio de sêmen coletado foi acima de 20 ml, concentração espermática de $4,9 \times 10^9$ espermatozoides/ml e pH médio de $8,2 \pm 0,2$.

Experimento 1. Efeito do pH do diluidor

Após a diluição, em solução de Saad com pH ajustado em diferentes valores, todas as amostras de sêmen apresentavam taxas de motilidade acima de 90% (dia 0) (Tabela 1 - dados apresentados a cada dois dias). A partir do dia 2, as taxas de motilidade espermática nas amostras de diluídas em solução com pH 8,8 e nas amostras de sêmen não diluídas começaram a cair significativamente mais rápido do que nas amostras diluídas em pH 7,0; 7,6 e 8,2. As amostras de sêmen diluídas na solução de Saad em pH 7,6 mantiveram taxas de motilidade maiores ($P < 0,05$) após 6 dias, em relação ao sêmen diluído nas demais soluções e no sêmen não diluído, que apresentou a menor taxa de motilidade espermática a partir do dia 2. Durante o experimento, uma oscilação significativa no pH, em todas as soluções testadas e no pH do sêmen não diluído, foi observada pelo teste de médias (Scott Knott $P < 0,05$) (Tabela 1) e ANAVA de regressão ($P < 0,05$) (Figura 1). No sêmen não diluído, foi observada uma acidificação acentuada durante o resfriamento.

TABELA 1. Motilidade (%) (média \pm DP, n = 3) do sêmen de piracanjuba diluído (1:10 volume final) em solução de Saad ajustada em diferentes pH e resfriado entre 4°C-6°C, por 7 dias

pH Solução Saad	Duração do resfriamento (dias) *				
	0	2	4	6	7
	Motilidade espermática (%)				
7,0	93 \pm 6 ^a	80 \pm 10 ^a	57 \pm 12 ^a	47 \pm 15 ^b	30 \pm 10 ^b
7,6	100 \pm 0 ^a	82 \pm 13 ^a	67 \pm 6 ^a	63 \pm 12 ^a	45 \pm 15 ^a
8,2	100 \pm 0 ^a	77 \pm 15 ^a	60 \pm 10 ^a	37 \pm 12 ^b	27 \pm 12 ^b
8,8	95 \pm 5 ^a	43 \pm 12 ^b	10 \pm 10 ^b	0 \pm 0 ^c	0 \pm 0 ^c
Sêmen não diluído	100 \pm 0 ^a	33 \pm 6 ^b	7 \pm 5 ^b	0 \pm 0 ^c	0 \pm 0 ^c
	Variações no pH do sêmen				
7,0	7,1 \pm 0,1 ^A	7,3 \pm 0,1 ^B	7,5 \pm 0,1 ^C	7,5 \pm 0,1 ^C	7,5 \pm 0,1 ^C
7,6	7,6 \pm 0,1 ^A	7,5 \pm 0,2 ^A	7,8 \pm 0,1 ^B	7,7 \pm 0,1 ^B	7,7 \pm 0,3 ^B
8,2	8,2 \pm 0,1 ^A	8,2 \pm 0,1 ^A	8,2 \pm 0,1 ^A	8,1 \pm 0,1 ^B	8,2 \pm 0,1 ^A
8,8	8,7 \pm 0,1 ^A	8,6 \pm 0,1 ^B	8,5 \pm 0,2 ^B	8,4 \pm 0 ^C	8,5 \pm 0,1 ^B
Sêmen não diluído	8,1 \pm 0,1 ^A	7,6 \pm 0 ^B	6,4 \pm 0 ^C	6,3 \pm 0 ^C	6,2 \pm 0 ^C

Médias seguidas de diferentes sobrescritos minúsculos (coluna) e maiúsculos (linha) são significativamente diferentes (Scott Knot; P < 0,05)

* Dados apresentados a cada 2 dias

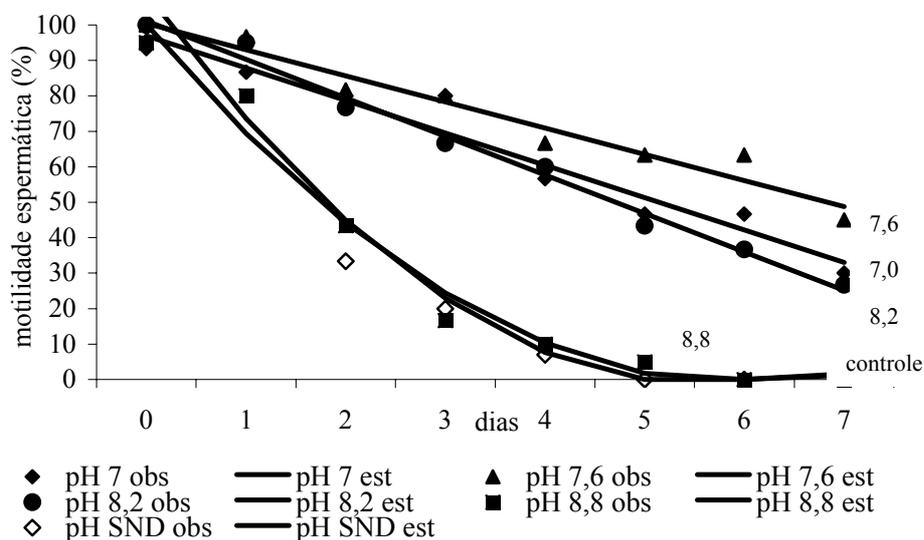


FIGURA 1. Motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (n = 3) diluído em solução de Saad em diferentes pHs e sêmen não diluído (controle) durante resfriamento 4°C-6°C, por 7 dias.

Experimento 2. Correlação entre motilidade espermática e crescimento bacteriano, durante o resfriamento

Logo após a diluição, o sêmen apresentou motilidade espermática média de 93% e uma população bacteriana de 1×10^4 UFC/mL. Os valores de pH do sêmen diluído se mantiveram próximos ao valor ajustado para a solução de Saad (7,6), com pequenas variações que se mantiveram entre 7,7 e 7,9. Foi observada uma correlação negativa ($r = -0,76$) significativa ($P < 0,01$), pelo teste T, com relação ao aumento progressivo no número de bactérias (UFC) e queda acentuada das taxas de motilidade espermática ao longo do período de 8 dias de resfriamento (Tabela 2 - dados expressos a cada 2 dias) (Figura 2 Anexo B).

TABELA 2. Variação da motilidade espermática (%) e crescimento bacteriano (UFCs/ml) do sêmen (n = 6 machos) de piracanjuba diluído em solução de Saad, durante 8 dias de armazenamento, a 4°C-6°C (Experimento 2)

	Dias de resfriamento				
	0	2	4	6	8
*Motilidade (%)	93 ± 6	67 ± 12	34 ± 25	17 ± 16	1 ± 2
* n° de bactérias UFCs/ml	1,0 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶	4,5 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁷

* r = -0,76 (P <0,01).

Experimento 3. Seleção de antibióticos

Das 53 colônias bacterianas submetidas ao teste de sensibilidade *in vitro*, 92,4% foram sensíveis à gentamicina (10 µg), e de 30% a 40% das colônias foram sensíveis a ampicilina, estreptomicina e penicilina G e apenas 3,8% sensíveis à lincomicina (Tabela 3).

TABELA 3. Sensibilidade *in vitro* (testes de discos de difusão) de 53 colônias bacterianas isoladas de sêmen resfriado de piracanjuba (Experimento 3)

Antibiótico	n° de linhagens (%)		
	Sensível	Intermediária	Resistente
Ampicilina (30 µg)	21 (39,6%)	6 (11,3%)	26 (49,0%)
Estreptomicina (10 µg)	15 (28,3%)	2 (3,8%)	36 (67,9%)
Gentamicina (10 µg)	49 (92,4%)	1 (1,9%)	3 (5,6%)
Lincomicina (10 µg)	2 (3,8%)	0 (0%)	51 (96,2%)
Penicilina G (10 UI)	17 (32,0%)	1 (1,9%)	35 (66,0%)

Experimento 4. Efeito da gentamicina na motilidade espermática e crescimento bacteriano

Durante esse experimento, foi avaliada a contaminação bacteriana no sêmen diluído com e sem gentamicina. A concentração de 0,1mg/ml de gentamicina foi a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano no sêmen resfriado de piracanjuba (Tabela 4). Entretanto, a adição de gentamicina na solução diluidora de sêmen manteve maiores taxas de motilidade espermática ($P < 0,05$) apenas no dia 4 de resfriamento, em relação ao controle. No dia 6, o sêmen diluído nas soluções contendo 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL de gentamicina apresentou maior taxa de motilidade ($P < 0,05$) em relação ao controle e a solução de 0,01 mg/mL (Tabela 4). Após 8 dias de resfriamento, todas as amostras de sêmen diluído em meio contendo gentamicina ou não apresentaram taxas de motilidade abaixo de 10%. Os dados de motilidade espermática também foram submetidos à análise de regressão. Pela equação obtida pelo desdobramento das concentrações de gentamicina para o dia 6 ($\hat{Y} = 375,405866 x^3 - 593,462608 x^2 + 228,040706x + 13,768863$), foi possível estimar a motilidade espermática para concentrações não testadas (Figura 3. Anexo B).

TABELA 4. Motilidade (%) e crescimento bacteriano (UFC/ml) do sêmen de piracanjuba (n=8 machos) resfriado em solução de Saad, em diferentes concentrações de sulfato de gentamicina, durante 8 dias de armazenamento (Experimento 4)

Gentamicina mg/mL	Duração do resfriamento 4-6°C (dias)*				
	0	2	4	6	8
	Motilidade (%)				
0	95 ± 6 ^{aA}	68 ± 10 ^{aA}	26 ± 19 ^{bB}	11 ± 14 ^{bD}	1 ± 2 ^{aD}
0,01	95 ± 6 ^{aA}	56 ± 7 ^{aB}	36 ± 7 ^{aC}	19 ± 16 ^{bD}	0 ± 0 ^{aD}
0,1	96 ± 4 ^{aA}	67 ± 10 ^{aB}	47 ± 18 ^{aC}	31 ± 19 ^{aC}	10 ± 16 ^{aD}
0,5	95 ± 6 ^{aA}	69 ± 7 ^{aB}	40 ± 14 ^{aC}	26 ± 13 ^{aD}	5 ± 7 ^{aD}
1,0	95 ± 4 ^{aA}	68 ± 7 ^{aB}	44 ± 10 ^{aC}	24 ± 14 ^{aD}	6 ± 12 ^{aD}
	Crescimento bacteriano (UFC/ml)				
0	1,4 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁶	4,31 x 10 ⁸	4,12 x 10 ¹⁰	3,25 x 10 ¹¹
0,01	*	2,3 x 10	0	4,79 x 10 ²	3,50 x 10 ²
0,1	*	0	0	0	0
0,5	*	0	0	0	0
1,0	*	0	0	0	0

Médias seguidas por diferentes sobrescritos minúsculos (coluna) e maiúsculos (linha) diferem significativamente (P < 0,05) (Scott Knott, 1974)

* dados apresentados a cada 2 dias

Experimento 5. Efeito da gentamicina na taxa de fertilização do sêmen

Quando os ovócitos foram fertilizados com sêmen recém-coletado diluído em solução de Saad com 0 e 0,1mg/ml de sulfato de gentamicina, as taxas de fertilização foram significativamente (P < 0,05) maiores do que quando os ovócitos foram fertilizados com sêmen contendo concentrações de 0,01; 0,5 e 1,0 mg/ml de gentamicina (Tabela 5).

TABELA 5. Taxas de fertilização de ovócitos fertilizados com sêmen diluído em solução de Saad, em diferentes concentrações de gentamicina (médias n = 4), sem armazenamento

Gentamicina mg/ml	Taxas de fertilização (%)
0	89 ± 6 ^a
0,01	83 ± 2 ^a
0,1	85 ± 7 ^a
0,5	69 ± 9 ^b
1,0	57 ± 5 ^c

^a - ^c médias seguidas de sobrescritos diferentes na coluna diferem significativamente entre si (Scott-Knott, P<0,05).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a motilidade, o pH e a presença de bactérias no sêmen de piracanjuba foram avaliados durante um período de 7 a 8 dias de resfriamento. O diluidor utilizado foi a solução de Saad (NaCl 200 mM, Tris 30 mM, Saad et al., 1988), na proporção 1:10 (volume final), selecionada a partir do trabalho de preservação de sêmen de piracanjuba por meio do resfriamento, desenvolvido por Maria (2005). A solução de Saad é comumente utilizada como solução imobilizadora de motilidade espermática do bagre-europeu (*Silurus glanis*), superando as propriedades ativadoras proporcionadas pela contaminação com água ou urina, durante a coleta de sêmen (Linhart et al., 1993).

pH da solução diluidora

O valor de pH mensurado de sêmen de piracanjuba *in natura* foi, em média, 8,2 ± 0,2 (n=17). Existem poucos relatos, na literatura, sobre o valor ideal de pH dos diluidores de sêmen. Para a espécie de peixe estudada, o uso de solução de Saad ajustada em pH 7,6, por meio da titulação com HCl, demonstrou ser mais eficiente (P<0,05) na manutenção da motilidade

espermática em comparação com o sêmen diluído em soluções com pH 7,0; 8,2 e 8,8 ou, ainda, com o sêmen não diluído. Além disso, a solução de Saad possui Tris, que tem ação tamponante e manteve o pH 7,6 da solução com pequenas oscilações entre 7,5 e 7,8, durante o período de resfriamento em todos os experimentos realizados.

Crescimento bacteriano e viabilidade espermática

Embora o resfriamento de sêmen seja um método de preservação utilizado com frequência em teleósteos, inclusive em espécies tropicais (Maria et al., 2006; Oliveira, 2006; Marques, 2001; Moraes, 2004;), a limitação do armazenamento sempre foi creditado ao crescimento bacteriano. A contaminação do sêmen pode ocorrer durante a coleta, o processamento, o armazenamento e o transporte (Jenkins, 2000). No presente estudo, a queda da motilidade espermática foi negativamente correlacionada ao crescimento exponencial das unidades formadoras de colônia bacterianas (UFC). Apesar dos cuidados com a higiene durante a coleta, com os recipientes, diluidores e com o manuseio do sêmen foi observada, no experimento 2, uma contagem inicial (dia 0) de bactérias de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL de sêmen, chegando ao final do período de armazenamento com $1,1 \times 10^7$ UFC/mL de sêmen.

No experimento 4, novas amostras de sêmen diluídas em solução de Saad também demonstraram uma contagem inicial de $1,4 \times 10^4$ UFC/mL, semelhante à encontrada no experimento 2. Contudo, foi observada uma população de final de $3,2 \times 10^{11}$, bastante superior à observada no experimento 2. A contagem das UFC foi obtida de amostras de sêmen de animais diferentes e sugere uma variação na dinâmica populacional de bactérias presentes, o que reforça a necessidade do uso de antibióticos que sejam eficientes na inibição do crescimento dessas bactérias. Deve-se salientar também que as amostras

permaneceram em tubos de vidro abertos durante o armazenamento, para permitir troca de oxigênio.

A presença de bactérias tem sido associada com a diminuição das taxas de fertilidade de sêmen de salmão-do-atlântico (Stoss e Refstie, 1983), da motilidade e da fertilidade de sêmen de carpa-comum (Saad et al., 1988) e da motilidade espermática de sêmen do bagre-do-canal (Christensen e Tiersch, 1996). No trabalho de Christensen e Tiersch (1996), a presença bacteriana, à microscopia de campo escuro, foi considerada significativa quando o número de bactérias foi estimado ser igual ou maior que o número de células espermáticas. No entanto, em nenhum destes trabalhos foi dada atenção à quantificação e à identificação dos microrganismos presentes. Foi encontrado apenas um registro de estudo bacteriológico em sêmen resfriado de peixe, em *Ictalurus punctatu*, bagre-do-canal (Jenkins e Tiersch, 1997). Até o momento, além da presente dissertação, não há relatos na literatura sobre bacteriologia em sêmen armazenado de piracanjuba.

A diminuição da motilidade do sêmen de bagre-do-canal armazenado a 4°C foi associada diretamente com um aumento de populações de bactérias (Jenkins e Tiersch, 1997). Foram observadas também mudanças morfológicas nos espermatozóides durante o armazenamento, semelhantes a alterações anteriormente descritas para sêmen resfriado de carpa (Saad et al., 1988). De acordo com Jenkins e Tiersch (1997), diferenças iniciais na motilidade das amostras de sêmen podem ser atribuídas às variabilidades individuais dos machos e, alternativamente, poderiam ser influenciadas por microrganismos originários da flora comensal dos testículos.

Inibição do crescimento bacteriano

Os testes de sensibilidade *in vitro* (testes de discos de difusão) apontaram a gentamicina como o antibiótico mais eficiente contra os

microrganismos presentes no sêmen de piracanjuba em relação às demais drogas testadas. Os antibióticos utilizados no teste foram escolhidos porque já haviam sido citados em trabalhos anteriores com resfriamento de sêmen de peixe (Segovia et al., 1999; Christensen & Tiersch, 1996; Degraaf & Berlinsky, 2004; Maria et al., 2006) e outros animais domésticos.

Devido às suas características farmacológicas e mecanismo de ação, é comum o uso da associação de penicilinas e estreptomicina. Contudo, foi observado, neste teste de sensibilidade, que 47,2% das amostras testadas apresentaram resistência cruzada à penicilina e à estreptomicina e 32,0% das amostras testadas foram resistentes a quatro das cinco drogas testadas (Tabela 7 Anexo A).

Este teste de antibiograma é muito útil na escolha das melhores bases terapêuticas para diversas condições, sendo um método padronizado por comitê internacional (National Committee For Clinical Laboratory Studies, NCCLS, 1990 e 1997).

A adição de 1% de um coquetel de antibióticos comercial ao diluidor usado em algumas amostras de sêmen de bagre-do-canal prolongou o tempo de armazenamento antes que a diminuição da motilidade fosse observada (Christensen and Tiersch, 1996). A inibição do crescimento bacteriano pela adição de antibióticos ao sêmen refrigerado tem melhorado a viabilidade e o período de armazenamento de espermatozóides de *Cyprinus carpio*, ou carpa-comum; *Salmo salar*, ou salmão-do-Atlântico e *Salmo trutta*, ou truta-marrom (Saad et al., 1988; Stoss, 1983; Stoss e Refstie, 1983, respectivamente).

Segovia et al. (2000) observaram, por meio da citometria de fluxo, que amostras de sêmen de *Oreochromis niloticus*, ou tilápia-do-Nilo, resfriadas com adição de antibióticos, demonstraram maiores percentagens de viabilidade espermática e função mitocondrial do que amostras controle (sem antibióticos), durante o armazenamento. Foi encontrada alta correlação entre motilidade e

viabilidade espermática e função mitocondrial. Entre os tratamentos utilizados por esses autores, o percentual de viabilidade espermática foi menor quando as amostras foram diluídas em todas as concentrações de ampicilina (0,75; 0,5 e 0,25 mg/mL), nas mais altas concentrações de gentamicina (0.75mg/mL) e numa concentração de 50% de um coquetel de antibióticos e antifúngico. A função mitocondrial foi reduzida nas amostras com as maiores concentrações de cada antibiótico.

No presente estudo, foi avaliada a variação da motilidade espermática do sêmen diluído em solução contendo gentamicina, mediante a ausência ou a diminuição de uma população bacteriana. A adição de gentamicina nas concentrações testadas não demonstrou alteração na motilidade espermática inicial em relação ao sêmen diluído sem adição de gentamicina (Tabela 4). Diferente do que foi observado por Maria et al. (2006), neste estudo observou-se que sêmen diluído em soluções contendo gentamicina manteve maiores taxas de motilidade espermáticas do que amostras diluídas em solução de Saad sem gentamicina, entre os dias 4 e 6. Após 6 dias de resfriamento, o sêmen diluído em solução de Saad contendo 0,1 mg/mL de gentamicina apresentou média de motilidade espermática superior ao controle (0 mg/mL gentamicina) e ao sêmen diluído em solução contendo 0,01mg/mL de gentamicina. De acordo com a equação de regressão, poderia ser obtido um valor máximo de motilidade espermática de 39,5%, para o 6º dia, utilizando-se uma concentração de 0,25 mg/mL de gentamicina. Essa concentração foi testada por Maria et al. (2006) que obtiveram, nesse estudo, média de motilidade espermática de 37%, após 7 dias de resfriamento, a qual foi semelhante em amostras de sêmen diluídas em solução de Saad sem adição de gentamicina.

Quanto à presença e ao crescimento de bactérias no sêmen, monitorado paralelamente, todas as concentrações de gentamicina testadas foram eficientes em inibir a proliferação das bactérias. Porém, a solução com concentração de

0,01 mg/mL de gentamicina permitiu o aparecimento de algumas populações bacterianas durante o resfriamento (Figura 3, Anexo B). A solução de menor concentração capaz de inibir completamente a presença de bactérias no sêmen diluído foi 0,1 mg/mL de gentamicina. Além disso, o sêmen diluído em solução de 0,1 e 0,01 mg/mL de gentamicina demonstrou sucesso na fertilização de ovócitos. Apesar do efeito positivo do uso de gentamicina sobre a inibição do crescimento bacteriano e, por conseqüência, um possível efeito benéfico sobre a motilidade espermática, deve-se levar em consideração a variabilidade individual dos machos que sempre é um fator relevante na avaliação do sêmen de um reprodutor.

Embora o crescimento bacteriano tenha sido controlado com sucesso pela adição da gentamicina, a motilidade espermática continuou a cair e o período de armazenamento não ultrapassou oito dias de resfriamento. As possíveis causas desse curto período de viabilidade espermática podem ser diversas, como consumo de oxigênio da amostra, déficit de nutrientes e íons (K, Ca), enzimas e toxinas liberadas pela morte celular (espermatozóides/bactérias), fatores genéticos relacionados à sobrevivência dos espermatozóides (requisitos da espécie), etc.

Christensen e Tiersch (1996) testaram o uso de diferentes recipientes e a adição de oxigênio para armazenamento de sêmen de bagre-do-canal. Foi utilizado béquer de plástico de 100 mL, coberto com filme plástico, tubos de ensaio de 15 mL e saco plástico ZipLoc[®], com e sem oxigênio. Amostras em recipiente com oxigênio tiveram sua motilidade prolongada, retardando a observação de bactérias nas amostras a microscopia de luz. Não houve diferença entre as amostras em béquer e em tubos. No presente estudo, amostras de 6,0 mL de sêmen diluído foram mantidas em tubos de vidro de 10 mL abertos para permitir a entrada de oxigênio.

Um aporte maior de oxigênio pode exercer uma melhora no metabolismo e aumentar o período de sobrevivência das células espermáticas. Segovia et al. (2000) utilizaram um coquetel de antibiótico e antifúngico comercial, em seus diluidores, para prolongar o período de armazenamento do sêmen de tilápia-do-Nilo, durante o resfriamento. Para a realização deste estudo, optou-se pela suplementação do meio de cultura com Nistatina[®], para que se evitasse o crescimento de fungos e leveduras nas placas de Petri. Estes microrganismos se desenvolvem em ambientes aquecidos e com relativa umidade, competindo com as bactérias pelos nutrientes do meio, mas, apesar de presentes, provavelmente, não interferiram na qualidade do sêmen resfriado a 4°C-6°C.

Neste estudo, observou-se que, mesmo sob condições de temperaturas mais baixas (4°C-6°C), o sêmen contaminado, seja durante a coleta, manuseio ou armazenamento, permite o crescimento de populações bacterianas. As bactérias capazes de crescer a essas temperaturas podem ser classificadas em dois grupos: psicrófilos e mesófilos psicrotolerantes. Para os psicrófilos, a temperatura ótima de crescimento é de 15°C ou inferior e eles são responsáveis pela deterioração de alimentos armazenados por período prolongado em refrigerador. Contudo, morrem rapidamente se expostos à temperatura ambiente. Bactérias capazes de crescer até a 0°C, mas com crescimento ótimo entre 20°C e 40°C, são denominadas mesófilas psicrotolerantes ou psicrotróficas. Esta, provavelmente, é a principal classe de bactérias presentes nas amostras de sêmen analisadas neste estudo. Estas também são as principais classes de bactérias presentes nos ambientes aquáticos.

A presença de bactérias compromete a viabilidade do sêmen, por diversos aspectos, como competição por oxigênio, consumo de nutrientes do plasma seminal, produção de toxinas, etc. No entanto, não é o único fator envolvido na queda de motilidade e perda da viabilidade dos espermatozoides de

piracanjuba durante o resfriamento, uma vez que, mesmo na ausência de bactérias após um período de armazenamento, os índices de motilidade caem acentuadamente. A adição de gentamicina em 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL no diluidor manteve índices de motilidade espermática mais altos nas amostras testadas em relação ao controle, a partir do dia 4 à concentração de 0,01 mg/mL no dia 6. A concentração de 0,1 mg/mL demonstrou ser a menor concentração capaz de inibir efetivamente o crescimento bacteriano e manter bons índices de fertilização de ovócitos para piracanjuba, nas condições do experimento.

Os resultados apresentados com a gentamicina justificam sua utilização na manutenção do material genético livre de contaminantes bacterianos e diminuindo o potencial risco de transferência de microrganismos de patogenicidade desconhecida entre plantéis e entre instalações de finalidade diferenciadas. É importante que se desenvolvam estudos que envolvam a avaliação das bactérias presentes no sêmen (capítulo 3 desta dissertação) e de substâncias bioativas potencialmente secretadas por estas, que possam provocar toxicidade nas células espermáticas e modificações do plasma seminal, ainda não caracterizado nessa espécie. Além disso, técnicas de citometria de fluxo podem ser usadas para avaliar índices de apoptose, integridade de membrana espermática e função mitocondrial.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILLARD, R. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 23, n. 1/4, p. 287-293, 1981.

BOITANO, S.; OMOTO, C. K. **Trout sperm swimming patterns: role of intracellular Ca²⁺**. **Cell Motil Cytoskeleton**, St. Paul, v. 21, p. 74-82, 1992.

CARNEIRO, D. O. **Avaliação e caracterização de populações bacterianas resistentes a antibióticos isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilapia do Nilo *Oreochromis niloticus***. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHRISTENSEN, J. M.; TIERSCH, T. R. Refrigerated Storage of Channel Catfish Sperm. **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 27, n. 3, p. 340-345, Sept. 1996.

DEGRAAF, J. D.; BERLINSKY, D. L. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 527-540, May 2004.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows® versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programas e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FREATO, T. **A morfometria, rendimento no processamento e inter-relações na avaliação de carcaça de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849)**. 2005. 102 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**. Piracicaba: Editora Franciscana, 1975. 309 p.

GOUDIE, C. A.; TIERSCH, T. R.; SIMCO, B. A.; DAVIS, K. B.; LIU, Q. Early growth and morphology among hybrids of ictalurid catfishes. **Journal of Applied Aquaculture**, Frankfurt, v. 3, n. 3/4, p. 235-255, 1993.

HARVEY, B. J.; KELLEY, R. N. Practical methods for chilled and frozen storage of tilapia spermatozoa. In: THE SECOND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 2., 1988, Makati-Manila.

ICLARM **Conference Proceedings...** Makati, Manila, Philipines, 1988. p. 187-189.

IHSSEN, P. E.; MCKAY, L. R.; MCMILLAN, I.; PHILLIPS, R. B. Ploidy maipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetics and fisheries applications. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 119, n. 4, p. 698-717, July 1990.

JENKINS, J. A. Minimizing microbial contamination of sperm samples In: TIERSCH, T. R.; MAZIK, P. M. (Ed.). **Criopreservação in aquatic species**. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 2000. p. 276-279,

JENKINS, J. A.; TIERSCH, T. R. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. **Journal World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 28, n. 3, p. 282-288, Sept. 1997.

LINHART, O.; BILLARD, R.; PROTEAU, J. P. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis L.*) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 115, n. 3/4, p. 347-359, Sept. 1993.

MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no cesfriamento e congelamento do cêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture, Amsterdam**, 2006. in press.

MARQUES, S. **Preservação a curto prazo do sêmen de teleósteos neotropicais de água doce**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

MARQUES, S.; GODINHO, H. P. Short-term cold storage of sperm from six neotropical characiformes fishes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 799-804, Sept. 2004.

MORAES, G. F. **Resfriamento e congelamento do sêmen de piau-açu (*Leporinus macrocephalus*)**. 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STUDIES -

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: Approved Standard. 4. ed. Villanova USA, 1997. (NCCLS document M7-A4).

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STUDIES - NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 4. ed. Villanova, USA, 1990. (NCCLS document M2-A4).

OLIVEIRA, A. V. **Resfriamento e criopreservação do sêmen de dourado *Salminus maxillosus* e de pirapitinga *Brycon nattereri***. 2006. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Mosby, 1994. 648 p.

RANA, K. J. Cryopreservation of fish spermatozoa. In: DAY, J. G.; McLELLAN, M. R. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New Jersey: Humana Press, 1995. p. 151-165.

SAAD, A.; BILLARD, R.; THERON, M. C.; HOLLEBECQ, M. G. Shortterm preservation of carp *Cyprinus carpio* semen. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 71, n. 1/2, p. 133-150, June 1988.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis methods for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SEGOVIA, M.; JENKINS, J. A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T. R. Flow Cytometric of Antibiotic Effects on Viability and Mitochondrial Function of Refrigerated Spermatozoa of Nile Tilapia. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 7, p. 1489-1499, Apr. 2000.

STOSS, J.; REFSTIE, T. Short-term cryopreservation of milt from atlantic salmon and sea trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 30, n. 1/4, p. 229-236, 1983.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Companhia Energética de Minas Gerais. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

VIVEIROS, A. T. M.; SO, N.; KOMEN, J. Sperm Cryopreservation of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Cryoprecipitants, Freezing Rates and sperm: Egg Dilution Ratio. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 9, p. 1305-1308, Sept. 2000.

CAPÍTULO 3

ESTUDO BACTERIOLÓGICO DO SÊMEN DE PIRACANJUBA *Brycon orbignyana* SUBMETIDO AO RESFRIAMENTO

**ESTUDO BACTERIOLÓGICO DO SÊMEN DE *Brycon orbignyanus*,
PIRACANJUBA, SUBMETIDO AO RESFRIAMENTO**

1 RESUMO

Este estudo foi realizado no intuito de identificar espécies bacterianas contaminantes presentes no sêmen de piracanjuba, durante um período de armazenamento de 8 dias, a 4°C-6°C. Durante este período, alíquotas de 500 µL de sêmen diluído em Saad foram rediluídas seriadamente em solução salina estéril e 100 µL dessas suspensões de sêmen foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar soja tripticaseína (TSA – Difco USA), suplementado com Nistatina® e incubadas em estufa 30°C, por 24 horas. Foi observado um aumento progressivo na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) nas placas e avaliada a viabilidade espermática por meio da motilidade em microscópio de luz. Foram isoladas 154 amostras, de acordo com características morfológicas das colônias que passaram por avaliação à coloração de Gram e por testes de triagem (catalase e oxidase). Dentre essas, 63 amostras foram submetidas a testes bioquímicos para a identificação da espécie. Foi observado um predomínio de espécies da família Enterobacteriaceae, sendo *Citrobacter freundii* a mais freqüente. Foram também identificadas diversas espécies do gênero *Aeromonas*, *Bacillus* e *Staphylococcus* coagulase negativo. A origem da contaminação pode ser diversa. É necessário que mais pesquisas sejam feitas para se determinar a origem desses microrganismos oportunistas do sêmen, mas, acredita-se que seja a água do tanque e ou muco do peixe. É recomendável uso de antibióticos para inibir esse crescimento e garantir o estoque de gametas com maior qualidade sanitária.

Palavras chaves: sêmen, resfriamento, bactérias, piracanjuba

Bacteriological study of piracanjuba *Brycon orbignyanus* semen under refrigeration

2 ABSTRACT

The aim of this study was to identify bacterial species present as contamination on piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen during a refrigeration time of 8 days, at 4°-6°C. Aliquots of 500 µL semen diluted in Saad solution were collected and diluted in sterile salt solution. Then, 100 µL of this dilution were inoculated in tryptcasein soy agar (TSA – Difco USA) with addition of Nistatin[®] and cultured at 30°C, for 24h. A progressive increase in the counts of colony forming units (CFU) was observed during the storage period and the sperm viability was evaluated by sperm motility, in light microscope. According to morphology characteristics, 154 isolates were evaluated by microscopy, Gram staining and selection tests (catalase, oxidase). Sixty-three isolates were selected and submitted to biochemical tests for species identification. Species from the family *Enterobacteriaceae* were predominant and *Citrobacter freundii* was the most frequent species. Besides, several species of the genera *Aeromonas*, *Bacillus* and *Staphylococcus* were identified. There may be several sources of semen contamination and more studies are necessary in order to determine these sources. The water of the tank or fish mucus can be regarded as probable sources of contamination. Using antibiotics in order to inhibit the presence of these microorganisms and ensure the storage of spermatozoa with greater quality is advisable.

Keywords: semen, refrigerated, bacterias, piracanjuba

3 INTRODUÇÃO

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, é uma das espécies de peixe nativa do Brasil em risco de extinção, devido a diversas modificações ambientais impostas pelo desenvolvimento humano. O armazenamento de gametas de espécies aquáticas pode ser usado para manter linhagens genéticas, ajudar na recuperação de espécies em extinção e maximizar a produção da piscicultura (Segovia et al., 2000). O resfriamento é uma técnica de armazenamento e preservação de sêmen a curto prazo, podendo ser estocado por um período que varia de poucas horas a meses, dependendo da espécie de peixe (Rana, 1995; Scott & Baynes 1980).

O uso de sêmen resfriado dispensa a necessidade de se manter um grande número de machos disponíveis para a fertilização artificial, permitindo o uso repetido de machos de alta qualidade reprodutiva para a produção de alevinos e um manuseio mais rápido e fácil do sêmen, quando os ovócitos estão disponíveis (Riley, 2002; Christensen & Tiersch, 1996). Dessa forma, o resfriamento possibilita que os esforços sejam focalizados na manutenção das ninhadas de fêmeas, desenvolvimento ovariano e aumento da eficiência reprodutiva, durante o processo de fertilização artificial (Riley, 2002). Contudo, a presença de microrganismos em amostras de gametas gera um potencial para transferência de agentes de doenças de fontes silvestres e incubadoras (Segovia, et al., 2000). Além disso, a presença de microrganismos em amostras armazenadas pode colocar em risco germoplasmas valiosos, pela diminuição da capacidade fertilizante e pela diminuição da qualidade e viabilidade celular (Jenkins, 2000b).

Embora sejam tomados cuidados para minimizar a contaminação do sêmen no momento da coleta, alguns autores têm observado a presença de bactérias em movimento em amostras de sêmen de peixe, quando levadas ao

microscópio de luz (Christensen & Tiersch, 1996; Riley, 2002). No entanto, nesses trabalhos, nenhuma atenção foi dada à classificação taxonômica ou à quantificação das bactérias nas amostras. A presença desses microrganismos sugere que a duração do armazenamento e a qualidade espermática possam ser comprometidas pela degradação da amostra (Riley, 2002).

O objetivo do presente estudo foi identificar e determinar o perfil de bactérias presentes em amostras de sêmen de piracanjuba, durante um período de resfriamento de oito dias.

4 MATERIAL DE MÉTODOS

Coleta e diluição do sêmen

Os experimentos foram conduzidos nos meses de novembro de 2005 a janeiro de 2006, durante o período reprodutivo da espécie. Foi utilizado sêmen de seis peixes da espécie piracanjuba, provenientes de represa da usina hidrelétrica da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) e alojados na estação de piscicultura da unidade de Itutinga, MG.

Para a coleta de sêmen, foram utilizados os procedimentos de rotina da estação de piscicultura. Para estimular a espermição, esses animais receberam indução hormonal com extrato de hipófise de carpa (4mg/kg). Após período de indução de 5 horas, os peixes foram retirados do aquário, higienizados e secos com papel toalha macio. A liberação de sêmen foi obtida por meio de leve compressão abdominal e o sêmen foi colocado em béquer de vidro limpo (não estéril) e seco. Foi verificada, logo após a coleta, a ausência de contaminantes, como água, sangue e urina no sêmen. Em seguida, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade espermática, por meio da ativação com solução de NaCl 50 mM (Maria et al., 2004) em microscópio de luz 100x. Apenas amostras que apresentassem, pelo menos, 80% de motilidade foram utilizadas.

Cada amostra de sêmen foi diluída na concentração de 1:10 em solução de Saad (NaCl 200 mM, Tris 30 mM; Saad et al., 1988), pH ajustado para 7,6 (cap. 2 dessa dissertação) e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore® - USA). As amostras de sêmen diluídas foram, então, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e encaminhadas ao Laboratório de Doenças dos Animais Aquáticos (AQUAVET) na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, onde foram realizados os experimentos. Entre a coleta do sêmen e a chegada ao laboratório e processamento das amostras, transcorreram cerca de 3 horas. No laboratório, durante as análises, as amostras de sêmen foram mantidas em refrigerador, entre 4°C-6°C em tubos de ensaio de 15 x 100 mm, abertos.

Determinação das espécies de bactérias contaminantes do sêmen

Para a detecção de bactérias nas amostras de sêmen, a população bacteriana foi quantificada pelo método de diluição e semeadura em superfície de ágar (Quinn et al., 1994). Amostras de 500 µL de sêmen diluído em Saad foram rediluídas seriadamente em base 10, variando de 10^{-1} a 10^{-10} , em solução salina estéril (NaCl 0,85%). Aliquotas de 100 µL do sêmen diluído em concentrações adequadas foram semeadas em duplicata, pelo método *spread plate*, em placas de Petri contendo ágar soja trypticaseína (TSA, Biolife - Itália) suplementado com Nistatina®, 1.000 UI/ml para a prevenção do crescimento de leveduras (Carneiro, 2005). Em seguida, as placas foram incubadas a 30°C, por 24 horas. A quantificação foi feita por contagem de colônias nas diluições adequadas (placas que apresentem entre 30 e 300 colônias). Durante todo o experimento, o sêmen foi armazenado à temperatura de 4°C-6°C. Neste período, foi também avaliada a viabilidade dos gametas, por meio do percentual de motilidade espermática (capítulo 2 desta dissertação).

Amostras bacterianas de diferentes morfotipos presentes no sêmen resfriado foram selecionadas para repique e isolamento. As bactérias isoladas foram submetidas aos testes de triagem de coloração de Gram, provas de catalase e oxidase. A partir dos testes de triagem, foram selecionadas algumas bactérias representativas que apresentavam diferentes perfis e congeladas em caldo soja tripticaseína contendo glicerol 15% (v/v) e armazenadas em freezer a -70°C , para análise posterior. Para a identificação fenotípica, as amostras bacterianas previamente congeladas foram submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente e, em seguida, semeadas por estrias em ágar soja tripticaseína (TSA) e incubadas a 30°C , por 24 horas.

Amostras sugestivas de *Aeromonas* sp. foram submetidas aos seguintes testes de identificação fenotípica: fermentação de açúcares (arabinose, dextrina, glicose, manitol, mioinositol, sacarose, salicina, trealose), utilização de aminoácidos (arginina, lisina, ornitina), hidrólise de esculina e produção de acetoína (Voges-Proskauer) (Janda e Abbott, 1998).

Nos testes de utilização de aminoácidos foi empregado o caldo Möeller descarboxilase (Biolife, Itália), suplementado com os respectivos aminoácidos na concentração de 1% e incubado em estufa, à temperatura de 30°C , por 24-48 horas (Mac Faddin, 1980). A hidrólise de esculina foi avaliada utilizando-se o caldo base acrescido de esculina (Merck, USA), incubado em estufa à temperatura de 30°C , durante 5 dias (Quinn, et al., 1994). Para a verificação da produção de acetoína, foi utilizado o caldo Voges-Proskauer, incubado à temperatura de 30°C , por 5 dias e, para a revelação, foi utilizado KOH 40% e α -naftol (Mac Faddin, 1980).

Amostras de bactérias gram-negativas foram identificadas pelos kits API 20E, API 20NE (Biomérieux – França) e BacTray 1 e 2 (Laborclin – Brasil), segundo recomendações dos fabricantes. Os resultados obtidos foram interpretados utilizando-se os softwares de identificação fenotípica Apiweb e

BacTray. Bactérias gram-positivas foram, presumivelmente, identificadas pelos testes de Gram, catalase, oxidase, crescimento em ágar Mac Conkey e coagulase, utilizando-se plasma de coelho (Quinn, et al., 1994).

5 RESULTADOS

Foi observada uma considerável diversidade na microbiota examinada, havendo um predomínio de bacilos gram-negativos, catalase positivos, oxidase negativos. Foram identificadas mais de cinco famílias diferentes de microrganismos, como observado na Tabela 1. Entre 154 amostras isoladas na triagem, 63 (39,8% do total) amostras consideradas representativas foram congeladas para posterior identificação. No entanto, no momento da reativação das amostras congeladas, uma não cresceu no meio de cultivo. Foram identificadas (Tabela 2) algumas bactérias pertencentes aos gêneros *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. e diversas espécies da família *Enterobacteriaceae*.

TABELA 1. Caracterização das famílias de 154 amostras bacterianas isoladas de sêmen de piracanjuba (n = 6 peixes), durante resfriamento a 4°C-6°C

Morfologia	Gram	Catalase	Oxidase	FAMÍLIA	Total
Bacilo	N	P	N	<i>Enterobacteriaceae</i>	58
Bacilo	N	P	P	<i>Aeromonadaceae/Pseudomonadaceae</i>	40
Bacilo	N	N	P	Não identificada	16
Bacilo	P	P	N	<i>Bacillaceae</i>	11
Cocos	P	P	N	<i>Micrococcaceae/Staphylococcaceae</i>	21
Cocos	P	N	N	<i>Streptococcaceae</i>	8

P = positivo; N = negativo

TABELA 2. Bactérias identificadas, oriundas de amostras de sêmen de piracanjuba, durante resfriamento a 4°C-6°C.

Espécies identificadas	Nº de amostras
<i>Aeromonas caviae</i>	1
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	1
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	1
<i>Aeromonas schubertii</i>	1
<i>Aeromonas veronii bt sobria</i>	1
<i>Bacillus</i> sp.	6
<i>Brevundimonas vesiculares</i>	4
<i>Burkholderia cepacia</i>	5
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	7
<i>Citrobacter koseri</i>	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	2
<i>Enterobacter sakasakii</i>	2
<i>Enterococcus</i> sp.	1
<i>Escherichia fergusonii</i>	1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3
<i>Pseudomonas putida</i>	1
<i>Serratia ficaria</i>	2
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	7
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>	2
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1
Não identificadas	2
Total	62

6 DISCUSSÃO

Não há dados disponíveis, na literatura, sobre bacteriologia de sêmen de piracanjuba armazenado. Há apenas um relato sobre estudo bacteriológico em sêmen de peixe, realizado por Jenkins & Tiersch (1997) em bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*). No experimento que originou as amostras do presente trabalho (capítulo 2 desta dissertação), foi observada uma significativa correlação negativa ($r = -0,76$; $P < 0,01$) relacionada à queda progressiva nas taxas de motilidade espermática paralela ao aumento significativo nas UFC, durante o período de armazenamento. Foram identificadas diversas espécies da família *Enterobacteriaceae*, conhecidas como bactérias entéricas. A origem dessas bactérias pode ser o próprio trato intestinal desses peixes. É possível que haja contaminação no interior do duto espermático próximo ao seu orifício externo, devido a sua proximidade com a saída do canal intestinal e, até mesmo, após a liberação do sêmen, uma vez que a papila urogenital por onde ele flui, é um orifício comum ao trato reprodutivo e à eliminação de excrementos para o ambiente externo.

Jenkins & Tiersch (1997) observaram que a diminuição da motilidade espermática e mudanças morfológicas nos espermatozoides de bagre-do-canal no sêmen, durante o armazenamento a 4°C, foram diretamente associadas ao aumento da prevalência de bactérias. A contaminação bacteriana pode prejudicar o sucesso da espermição artificial em peixes. No estudo realizado com sêmen de bagre-do-canal, de origem intratesticular, foram identificadas diversas espécies de bactérias (principalmente do gênero *Pseudomonas*) e foi sugerido que a motilidade espermática poderia, ainda, ser influenciada precocemente por microrganismos da microbiota comensal dos testículos. Contudo, a existência de microbiota comensal em vísceras não é comum (exceto intestinos), principalmente em se tratando de uma gônada, onde ocorre todo o processo de

espermatogênese e as células espermáticas são protegidas inclusive das células do sistema imune. Em um animal saudável reprodutivamente, em qualquer espécie, não há relatos de microbiota nos testículos. A diversidade da população bacteriana identificada no presente estudo, em sêmen de uma espécie neotropical, leva a crer que seria pouco provável que a origem dessas bactérias fosse o ambiente testicular.

Uma possível fonte de contaminação está relacionada a um eventual contato do sêmen com a pele do animal no momento da coleta, além da qualidade da água de abastecimento dos tanques e aquários. No presente trabalho, foram identificadas duas espécies do gênero, *P. fluorescens* e *P. putida*, no entanto, o gênero observado com maior frequência foi o *Citrobacter*, sendo considerável também as presenças de *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*, entre outras. Essa microbiota é bastante semelhante à observada em águas de abastecimento e em diversos sistemas de cultivo em ambiente tropical (Dal Pupo, 2006; Carneiro, 2005). É importante salientar, ainda, que, durante o armazenamento, as amostras de sêmen permaneceram em tubos de ensaio abertos para possibilitar trocas gasosas pelos espermatozoides, o que também constitui uma possível fonte de contaminação.

Algumas características das bactérias que, provavelmente, contribuem para a redução da qualidade espermática são produção de enzimas proteolíticas, consumo de nutrientes e oxigênio, e a motilidade das bactérias. No estudo realizado por Jenkins & Tiersch (1997), foram encontradas, predominantemente, bactérias do gênero *Pseudomonas* (65%), móveis e produtoras de enzimas proteolíticas. Segundo esses autores, por ocasião da morte e ruptura das células espermáticas, as proteínas liberadas poderiam providenciar nutrientes para bactérias e as proteases poderiam degradar outros espermatozoides.

Em experimentos anteriores (capítulo 2 desta dissertação) com sêmen de piracanjuba, a ausência de bactérias mediante o uso de gentamicina em concentrações acima de 0,1 mg/mL no diluidor de sêmen prolongou o período de armazenamento observado em relação ao controle (sem gentamicina), mantendo taxas de motilidade espermática próximas a 30%, por 6 dias ($P < 0,05$). A diversidade de espécies bacterianas observadas no sêmen dessa espécie de peixe suscita um risco potencial de transmissão de agentes patogênicos para os ovócitos e entre tanques de cultivo por meio do uso desse tipo de preservação de gametas, além de serem agentes patogênicos também ao homem. Assim, é recomendável o uso de antibióticos, em doses adequadas, nos diluidores para o resfriamento de sêmen de peixe.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARNEIRO, D. O. **Avaliação e caracterização de populações bacterianas resistentes a antibióticos isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHRISTENSEN, J. M.; TIERSCH, T. R. Refrigerated storage of channel catfish sperm. **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 27, n. 3, p. 340-345, Sept. 1996.

DAL PUPO, H. D. **Diversidade da microbiota Gram-negativa em sistemas de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2006. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. Review. **Clinical Infect Disease**, v.27, n. 2, p. 332-344, Aug. 1998.

JENKINS, J. A.; TIERSCH, T. R. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. **Journal World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 28, n. 3, p. 282-288, Sept. 1997.

JENKINS, J. A. Infections disease and quality assurance considerations for the transfer of cryopreserved fish gametes. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. (Ed.) **Criopreservation in Aquatic Species**. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society, 2000. p. 276-279.

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. 2. ed. Baltimore, 1980. 527 p.

RANA, K. J. Cryopreservation of fish spermatozoa. In: DAY, J. G.; McLELLAN, M. R. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New Jersey: Humana Press, 1995. p. 151-165.

RILEY, K. L. P. **Refrigerated Storage and Cryopreservation of Sperm for the Production of Red Snapper and Snapper Hybrids**. 2002. 192 p. Thesis (Phd) - Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

SEGOVIA, M.; JENKINS, J. A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T. R. Flow cytometric of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 7, p. 1489-1499, Apr. 2000.

SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. A review of biology, handling and storage of salmonids spermatozoa. **Journal of Fish Biology**, London, v. 17, n. 6, p. 707-739, 1980.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO GERAL

1. Resfriamento de sêmen e fertilização artificial

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, é encontrada nas bacias dos rios Grande, Paraná e Paraguai. Por ser uma espécie de piracema (reofilica), diversas fases importantes da sua vida são prejudicadas pela construção de usinas hidrelétricas. As barragens constituem barreira intransponível na sua rota migratória, reduzindo ou eliminando sua eficiência reprodutiva e o retorno dos alevinos ao leito dos rios, o que tem ocasionado, entre outros fatores, o desaparecimento dessa espécie de peixe, incluindo-a nas listas de animais ameaçados de extinção (Vaz et al., 2000). Para melhorar a eficiência reprodutiva dessa espécie e aumentar o repovoamento dos rios, é necessária a realização de fertilização artificial que, cada vez mais, exige técnicas práticas que facilitem tal manejo. Nesse breve capítulo, serão discutidos alguns aspectos abordados nessa dissertação, relativos ao resfriamento de sêmen de piracanjuba.

Foi testado resfriamento de sêmen diluído (1:10) em solução de Saad (NaCl 200mM, Tris 30mM-Saad et al., 1988; Maria, 2005), em quatro diferentes pHs, buscando um valor para a solução diluidora que não ativasse a motilidade e que fosse eficiente na manutenção da viabilidade das células espermáticas durante o armazenamento. Durante esse experimento, foi determinado o pH do sêmen in natura, como sendo $8,2 \pm 0,2$. Embora tenha sido testado o uso de solução diluidora em pH 8,2, a solução diluidora que apresentou a melhor capacidade de manter as células espermáticas viáveis possuía pH ajustado em 7,6. Foi avaliada, quantitativa e qualitativamente, a contaminação bacteriana (contagem em placas contendo ágar soja tripticaseína - TSA) nas amostras de sêmen a partir do primeiro dia de resfriamento. Apesar de o sêmen ter sido coletado em boas condições de higiene, foi observada uma população bacteriana média inicial de cerca de 1×10^4 UFC/mL de sêmen e essa população se manteve crescente.

Maria et al. (2006) obtiveram maior período de viabilidade em seus experimentos, o que foi atribuído ao maior cuidado com a coleta, que se supõe tratar-se de uma das principais fontes de contaminação bacteriana do sêmen. Nos experimentos do presente trabalho, foi observado que, enquanto a população bacteriana aumentava nas amostras de sêmen, houve um declínio acentuado nas taxas de motilidade espermática, demonstrando uma correlação negativa significativa entre esses fatores.

Um estudo bacteriológico de colônias da população bacteriana presente no sêmen foi realizado, tendo sido observada grande diversidade na população isolada, que foi composta por grande número de espécies gram-negativas entre *Enterobacteriaceas* e *Aeromonadaceas/Pseudomonadaceas*, além de cocos gram-positivos. A população bacteriana identificada foi bastante semelhante à descrita para a superfície e muco do peixe, por Hirsch (2003) e para água de diferentes sistemas de cultivo de peixe, por Carneiro (2005) e Dal Pupo (2006). A semelhança na caracterização da população bacteriana entre esses ambientes e o sêmen nos leva a crer que o grau de contaminação da água de cultivo e, conseqüentemente, da superfície e muco dos peixes está diretamente relacionado à presença desses microrganismos no sêmen. Essas considerações reforçam a necessidade de um maior cuidado durante a coleta, não permitindo que o sêmen escorra pelas nadadeiras e pela superfície do peixe.

O isolamento de colônias bacterianas presentes no sêmen durante o armazenamento foi útil também para traçar um perfil de susceptibilidade da população bacteriana a cinco antibióticos (penicilina, estreptomicina, ampicilina, lincomicina e gentamicina) comumente utilizados em diluidores de sêmen de mamíferos e ou que foram testados alguma vez em diluidores de sêmen de peixe (Segovia et al., 1999; Christensen e Tiersch, 1996; Degraaf e Berlinsky, 2004; Maria et al., 2006). A partir deste antibiograma, foi observado que 92,4% das amostras testadas foram susceptíveis à gentamicina e muitas foram

resistentes a mais de um antibiótico. Em uma etapa seguinte, testaram-se quatro diferentes concentrações de sulfato de gentamicina (0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL) adicionadas ao diluidor de sêmen e armazenadas a 4°C-6°C. Observou-se que as amostras diluídas em solução de Saad contendo 0,1mg/mL de sulfato de gentamicina mantiveram maiores taxas de motilidade em relação ao controle ($P<0,05$). Esta foi também a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento de bactérias nas amostras de sêmen.

Na etapa seguinte, testou-se o uso de sêmen diluído em Saad nas mesmas concentrações citadas acima para a fertilização de ovócitos de fêmeas induzidas hormonalmente. Devido à limitação de animais e de sêmen para a realização de experimentos no final do período reprodutivo foi utilizado sêmen de apenas dois machos diluídos (1:10) nas diferentes soluções (0 – controle; 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL) e, imediatamente, usados para a fertilização de ovócitos de uma fêmea em duplicata. As amostras de sêmen que apresentaram melhores taxas de fertilização em relação ao controle foram as diluídas em solução de Saad com 0,01 e 0,1mg/mL de gentamicina. Contudo, é importante que esse experimento seja repetido com maior número de animais e também com sêmen resfriado.

Conclui-se, a partir destes dados, que é importante o uso de um antibiótico nos diluidores para sêmen resfriado, para manter a qualidade microbiológica do material genético e com uma possível melhora na motilidade espermática. Entre os antibióticos testados, o sulfato de gentamicina foi o mais indicado para uso nos diluidores de sêmen dessa espécie por:

- manter maiores taxas de motilidade espermática durante o resfriamento;
- ser um antibiótico de amplo espectro e comprovadamente eficaz na inibição do crescimento bacteriano no sêmen resfriado;

- não comprometer a fertilização dos ovócitos quando utilizado em concentrações adequadas.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARNEIRO, D. O. **Avaliação e caracterização de populações bacterianas resistentes a antibióticos isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CHRISTENSEN, J. M.; TIERSCH, T. R. Refrigerated Storage of Channel Catfish Sperm. **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 27, n. 3, p. 340-345, Sept. 1996.
- DAL PUPO, H. D. **Diversidade da microbiota Gram-negativa em sistemas de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2006. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DEGRAAF, J. D.; BERLINSKY, D. L. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 527-540, May 2004.
- HIRSCH, D. **Identificação e resistência antimicrobiana de *Aeromonas* móveis provenientes de peixes e ambientes aquáticos**. 2004. 42 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MARIA, A. N. **Diluidores e crioprotetores no cesfriamento e congelamento do cêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 2005. 71 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture, Amsterdam**, 2006. in press.
- SAAD, A.; BILLARD, R.; THERON, M. C.; HOLLEBECQ, M. G. Shortterm preservation of carp *Cyprinus carpio* semen. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 71, n. 1/2, p. 133-150, June 1988.
- SEGOVIA, M.; JENKINS, J. A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T. R. Flow Cytometric of Antibiotic Effects on Viability and Mitochondrial Function of Refrigerated Spermatozoa of Nile Tilapia. **Theriogenology**, Woburn, v. 53, n. 7, p. 1489-1499, Apr. 2000.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

ANEXOS

ANEXO A

- TABELA 1. Análise de variância do efeito da solução de Saad, em diferentes pH, sobre a motilidade espermática do sêmen de piracanjuba, durante o resfriamento 84
- TABELA 2. Tabela de análise de variância do desdobramento do pH da solução, dentro de cada nível de tempo, sobre a motilidade espermática do sêmen de piracanjuba, durante o resfriamento..... 84
- TABELA 3. TABELA 3. Análise de regressão do desdobramento de tempo (dias), em cada solução diluidora do sêmen com diferentes pH e para sêmen não diluído, durante resfriamento..... 85
- TABELA 4. TABELA 4. Equações de regressão para cálculo estimado da motilidade espermática de sêmen de piracanjuba, em função do tempo, durante os dias de resfriamento..... 85
- TABELA 5. Análise de variância da solução de Saad, em diferentes pH, em relação à variação de pH do sêmen de piracanjuba, durante o resfriamento..... 86
- TABELA 6. Análise de variância do desdobramento de tempo, dentro de cada nível de solução, para a variação de pH no sêmen de piracanjuba, durante o resfriamento 86
- Tabela 7. Percentagem de amostras que apresentaram resistência cruzada ou foram sensíveis a mais de um dos antibióticos testados (total de 56 amostras testadas) (Experimento 3).....87
- TABELA 8. Análise de variância do efeito de diferentes tratamentos de sulfato de gentamicina na solução diluidora de Saad sobre a motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (n= 8), durante resfriamento por 8 dias 88
- TABELA 9. Análise de variância do efeito do desdobramento de dias, em cada tratamento (concentração de gentamicina), sobre a motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (n= 8), durante resfriamento por 8 dias 88

TABELA 10. Análise de regressão para o desdobramento de tratamento (concentrações de gentamicina), para o 6º dia, em relação à motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (n= 8).....	89
TABELA 11. Análise de variância do efeito dos tratamentos com gentamicina sobre o crescimento bacteriano em sêmen de piracanjuba (n = 8), durante resfriamento por 8 dias	89
TABELA 12. Análise do desdobramento dos tratamentos (concentrações de gentamicina) para cada dia, em relação ao crescimento bacteriano em sêmen de piracanjuba (n= 8), durante 8 dias de resfriamento	90
TABELA 13. Análise do desdobramento dos dias para cada tratamento (concentrações de gentamicina) sobre o crescimento bacteriano, em sêmen de piracanjuba (n= 8), durante 8 dias de resfriamento	90
TABELA 14. Análise de regressão para o desdobramento de dias para o tratamento com 0 mg/mL de gentamicina na solução diluidora de Saad, com relação ao crescimento bacteriano no sêmen de piracanjuba (n= 8), durante o resfriamento	91
TABELA 15. Análise de regressão para o desdobramento de dias para o tratamento com 0,01 mg/mL de gentamicina na solução diluidora de Saad, em relação ao crescimento bacteriano no sêmen de piracanjuba (n= 8), durante o resfriamento	91
TABELA 16. Análise de variância do efeito de diferentes concentrações de gentamicina em sêmen diluído em solução de Saad sobre a taxa de fertilização dos ovócitos	92

TABELA 1. Análise de variância do efeito da solução de Saad, em diferentes pH, sobre a motilidade espermática do sêmen de piracanjuba, durante o resfriamento (Experimento 1)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	2	2770,850000	1385,425000	8,566	0,0103
TRAT	4	39114,533333	9778,633333	60,464	0,0000
erro 1	8	1293,816667	161,727083		
HORAS	7	86450,391667	12350,055952	321,457	0,0000
TRAT*HORAS	28	13822,400000	493,657143	12,849	0,0000
erro 2	70	2689,333333	38,419048		
Total corrigido	119	146141,325000			

CV 1 (%) =	23,92				
CV 2 (%) =	11,66				
Média geral:	53,1750000	Número de observações:	120		

TABELA 2. Tabela de análise de variância do desdobramento do pH da solução (TRAT), dentro de cada nível de tempo, sobre a motilidade espermática do sêmen de piracanjuba, durante o resfriamento (Experimento 1)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	/1 4	126,666667	31,666667	0,565	0,6888
TRAT	/2 4	610,000000	152,500000	2,722	0,0433
TRAT	/3 4	6273,333333	1568,333333	27,989	0,0000
TRAT	/4 4	12160,000000	3040,000000	54,252	0,0000
TRAT	/5 4	10133,600000	2533,400000	45,211	0,0000
TRAT	/6 4	9233,333333	2308,333333	41,195	0,0000
TRAT	/7 4	9693,333333	2423,333333	43,247	0,0000
TRAT	/8 4	4706,666667	1176,666667	20,999	0,0000
Resíduo	38	2129,310289	56,034481		
Resíduo	17	987.239583	58.072917		

Codificação usada para o desdobramento

cod. TEMPO

1 = 0

2 = 1

3 = 2

- 4 = 3
- 5 = 4
- 6 = 5
- 7 = 6
- 8 = 7

TABELA 3. Análise de regressão do desdobramento de tempo (dias), em cada solução diluidora do sêmen, com diferentes pH e para sêmen não diluído, durante resfriamento (Experimento 1)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DIAS	/1 7	11066,666667	1580,952381	41,150	0,0000
DIAS	/2 7	7212,500000	1030,357143	26,819	0,0000
DIAS	/3 7	15007,291667	2143,898810	55,803	0,0000
DIAS	/4 7	29679,166667	4239,880952	110,359	0,0000
DIAS	/5 7	37307,166667	5329,595238	138,723	0,0000
Resíduo	70	2689,333333	38,419048		

Codificação usada para o desdobramento
cod. TRAT

- 1 = 7,0
- 2 = 7,6
- 3 = 8,2
- 4 = 8,8
- 5 = sêmen não diluído

TABELA 4. Equações de regressão para cálculo estimado da motilidade espermática de sêmen de piracanjuba, em função do tempo, durante os dias de resfriamento (Experimento 1)

Valor de pH	Equação de regressão	R ²
7,0	$\hat{Y} = -0,38x + 96,94$	94,84%
7,6	$\hat{Y} = -0,31x + 100,41$	95,17%
8,2	$\hat{Y} = -0,45x + 101,11$	98,9%
8,8	$\hat{Y} = 0,005x^2 - 1,40x + 100,14$	97,83%
Sêmen não diluído	$\hat{Y} = 0,005x^2 - 1,61x + 108,91$	94,42%

TABELA 5. Análise de variância da solução de Saad, em diferentes pH, em relação à variação de pH do sêmen de piracanjuba, durante o resfriamento (Experimento 1)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
SOLUÇÃO	4	33,385500	8,346375	996,582	0,0000
BLOCOS	2	0,052167	0,026083	3,114	0,0999
erro 1	8	0,067000	0,008375		
TEMPO	7	3,409250	0,487036	79,749	0,0000
SOLUÇÃO*TEMPO	28	13,394500	0,478375	78,330	0,0000
erro 2	70	0,427500	0,006107		
Total corrigido		119	50,735917		
CV 1 (%) =	1.18				
CV 2 (%) =	1.01				
Média geral:	7.7641667	Número de observações:		120	

TABELA 6. Análise de variância do desdobramento de tempo, dentro de cada nível de solução, para a variação de pH no sêmen de piracanjuba, durante o resfriamento (Experimento 1)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TEMPO /1	7	0,458333	0,065476	10,721	0,0000
TEMPO /2	7	0,229583	0,032798	5,370	0,0001
TEMPO /3	7	15,432917	2,204702	361,004	0,0000
TEMPO /4	7	0,153333	0,021905	3,587	0,0023
TEMPO /5	7	0,529583	0,075655	12,388	0,0000
Resíduo	70	0,427500	0,006107		

Codificação usada para o desdobramento

cod. SOLUÇÃO

1 = 7

2 = 7,6

3 = sêmen não diluído

4 = 8,2

5 = 8,8

Teste Scott-Knott (1974)

Tabela 7. Percentagem de amostras que apresentaram resistência cruzada ou foram sensíveis a mais de um dos antibióticos testados (total de 53 amostras testadas) (Experimento 3)

Antibióticos	Linhagens resistentes (%)	Linhagens sensíveis (%)
Pen e Est	25 (47,1 %)	6 (11,3 %)
Pen e Amp	25 (47,1 %)	14 (26,4 %)
Est e Amp	17 (32,0 %)	6 (11,3%)
Est e Lin	35 (66,0 %)	1 (1,88 %)
Amp e Lin	26 (49,0 %)	2 (3,7 %)
Pen e Gen	2 (3,7 %)	16 (30,1 %)
Est e Gen	3 (5,6 %)	15 (28,3 %)
Amp e Gen	1 (1,88 %)	19 (35,8)
Lin e Gen	3 (5,6%)	2 (3,7 %)
Pen e Amp e Gen	1 (1,88 %)	13 (24,5 %)
Pen e Est e Gen	2 (3,7 %)	6 (11,3 %)
Est e Gen e Lin	2 (3,7 %)	1 (1,88 %)
Pen e Est e Amp	17 (32,0 %)	3 (5,6%)
Pen e Est e Gen e Lin	1 (1,88 %)	1 (1,88 %)
Pen e Est e Amp e Lin	17 (32,0 %)	3 (5,6%)
Pen e Est e Amp e Lin e Gen	1 (1,88 %)	3 (5,6%)

Penicilina = Pen; Estreptomicina = Est; Ampicilina = Amp; Gentamicina = Gen; Lincomicina = Lin.

TABELA 8. Análise de variância do efeito de diferentes concentrações de gentamicina na solução diluidora de Saad sobre a motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (n= 8), durante resfriamento por 8 dias (Experimento 4)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	7	16535,722222	2362,246032	3,641	0,0065
GENTAMICINA	4	6033,427778	1508,356944	2,325	0,0811
erro 1	28	18167,861111	648,852183		
HORAS	8	294539,255556	36817,406944	371,188	0,0000
GENT*DIAS	32	4968,522222	155,266319	1,565	0,0310
erro 2	280	27772,666667	99,188095		
Total corrigido	359	368017,455556			

CV 1 (%) =	53,64				
CV 2 (%) =	26,82				
Média geral:	43,9611111	Número de observações:	360		

TABELA 9. Análise de variância do efeito do desdobramento de dias em cada concentração de gentamicina sobre a motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (n= 8), durante resfriamento por 8 dias (Experimento 4)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DIAS	/1 8	76984,500000	9623,062500	97,018	0,0000
DIAS	/2 8	56360,250000	7045,031250	71,027	0,0000
DIAS	/3 8	51225,527778	6403,190972	64,556	0,0000
DIAS	/4 8	56212,000000	7026,500000	70,840	0,0000
DIAS	/5 8	58725,500000	7340,687500	74,008	0,0000
Resíduo	280	27772,666667	99,188095		

Codificação usada para o desdobramento

cod. TRATAMENTO

1 = 0

2 = 0,01

3 = 0,1

4 = 0,5

5 = 1

Teste Scott Knott (1974)

TABELA 10. Análise de regressão para o desdobramento das concentrações de gentamicina, para o 6º dia, em relação à motilidade espermática do sêmen de piracanjuba (n= 8) (Experimento 4)

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Prob.<F
b1	1	217,162863	217,162863	1,355	0,247
b2	1	476,652005	476,652005	2,974	0,087
b3	1	961,791642	961,791642	6,001	0,016
Desvio	1	118,543490	118,543490	0,740	0,391
Resíduo	120	19231,425926	160,261883		

Parâmetro	Estimativa	SE	t para	
			H0: Par=0	Pr> t
b0	13,768863	3,38455572	4,068	0,0001
b1	228,040706	79,12691658	2,882	0,0047
b2	-593,462608	228,45952697	- 2,598	0,0106
b3	375,405866	153,24124631	2,450	0,0157

R² = 93,32%

TABELA 11. Análise de variância do efeito dos tratamentos com gentamicina sobre o crescimento bacteriano em sêmen de piracanjuba (n = 8), durante resfriamento por 8 dias (Experimento 4)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTOS	4	661,226667	5,306667	20,605	0,0000
BLOCO	5	40,913333	8,182667	1,020	0,4323
erro 1	20	160,453333	8,022667		
DIAS	4	61,293333	15,323333	67,486	0,0000
TRATAMENTOS*DIAS	15	161,706667	10,780444	47,478	0,0000
erro 2	94	21,343730	0,227061		
Total corrigido	142	1106,937063			
CV 1 (%) =	226,28				
CV 2 (%) =	38,07				
Média geral:	1,2517483	Número de observações:	143		

TABELA 12. Análise do desdobramento das concentrações de gentamicina para cada dia, em relação ao crescimento bacteriano em sêmen de piracanjuba (n= 8), durante 8 dias de resfriamento (Experimento 4)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	/1 3	16,133333	5,377778	2,409	0,0898
TRATAMENTO	/2 4	50,533333	12,633333	5,658	0,0022
TRATAMENTO	/3 4	120,000000	30,000000	13,436	0,0000
TRATAMENTO	/4 4	270,133333	67,533333	30,247	0,0000
TRATAMENTO	/5 4	366,133333	91,533333	40,996	0,0000
Resíduo	25	55,818190	2,232728		

Codificação usada para o desdobramento

cod. DIAS

1 = 0

2 = 2

3 = 4

4 = 6

5 = 8

TABELA 13. Análise do desdobramento dos dias para cada concentração de gentamicina sobre o crescimento bacteriano em sêmen de piracanjuba (n= 8), durante 8 dias de resfriamento (Experimento 4)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DIAS	/1 4	211,466667	52,866667	23,678	0,0000
DIAS	/2 4	0,000000	0,000000	0,000	1,0000
DIAS	/3 3	0,000000	0,000000	0,000	1,0000
DIAS	/4 4	0,000000	0,000000	0,000	1,0000
DIAS	/5 4	11,533333	2,883333	1,291	0,2991
Resíduo	25	55,818190	2,232728		

Codificação usada para o desdobramento

cod. TRATAMENTOS

1 = 0

2 = 1,0

3 = 0,5

4 = 0,1

5 = 0,01

Teste Scott Knott (1974)

TABELA 14. Análise de regressão do desdobramento de dias para o tratamento com 0 mg/mL de gentamicina na solução diluidora de Saad, com relação ao crescimento bacteriano no sêmen de piracanjuba (n= 8), durante o resfriamento (Experimento 4)

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Prob.<F
b1	1	209,066667	209,066667	867,318	0,000
b2	1	0,190476	0,190476	0,790	0,376
b3	1	1,350000	1,350000	5,601	0,020
Desvio	1	0,859524	0,859524	3,566	0,062
Resíduo	95	22,899722	0,241050		

Parâmetro	t para			
	Estimativa	SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	1,878571	0,19900006	9,440	0,0000
b1	0,300595	0,25311793	1,188	0,2380
b2	0,199405	0,08035352	2,482	0,0148
b3	-0,015625	0,00660247	-2,367	0,0200

R² = 99,59%

TABELA 15. Análise de regressão do desdobramento de dias para o tratamento com 0,01 mg/mL de gentamicina na solução diluidora de Saad, em relação ao crescimento bacteriano no sêmen de piracanjuba (n= 8), durante o resfriamento (Experimento 4)

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Prob.<F
b1	1	8,066667	8,066667	33,465	0,000
b2	1	1,714286	1,714286	7,112	0,009
b3	1	0,600000	0,600000	2,489	0,118
Desvio	1	1,152381	1,152381	4,781	0,031
Resíduo	95	22,899722	0,241050		

Parâmetro	t para			
	Estimativa	SE	H0: Par=0	Pr> t
b0	0,152381	0,18863597	0,808	0,4212
b1	-0,102381	0,11172704	-0,916	0,3618
b2	0,035714	0,01339225	2,667	0,0090

R² = 84,81%

TABELA 16. Análise de variância do efeito de diferentes concentrações de gentamicina em sêmen diluído em solução de Saad sobre a taxa de fertilização dos ovócitos (Experimento 5)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	4	2710,300000	677,575000	19,431	0,0000
BLOCOS	1	84,050000	84,050000	2,410	0,1428
erro	14	488,200000	34,871429		
Total corrigido	19	3282,550000			
CV (%) =	7,73				
Média geral:	76,3500000		Número de observações:	20	

ANEXO B

- FIGURA 1. Variação média nos valores de pH observados no sêmen de piracanjuba (n=3) diluído em solução de Saad de diferentes pH, durante resfriamento a 4°C-6°C, por 7 dias. (Experimento 1).....94
- FIGURA 2. Correlação entre motilidade espermática e crescimento bacteriano ($r = -0,76$), em função do tempo, em sêmen de piracanjuba (n=6) submetido a resfriamento por 8 dias (Experimento 2)94
- FIGURA 3. Média de motilidade espermática observada e estimada (regressão) para sêmen de piracanjuba (n=8) diluído em solução de Saad, em diferentes concentrações de gentamicina, após 6 dias de resfriamento (Experimento 4)95
- FIGURA 4. Médias de crescimento bacteriano (log) observadas e estimadas por equação de regressão, em amostras de sêmen de piracanjuba (n=8) diluídas em solução de Saad sem gentamicina (0 mg/mL) e com 0,01 mg/mL de gentamicina, durante o resfriamento por 8 dias. (Experimento 4)95

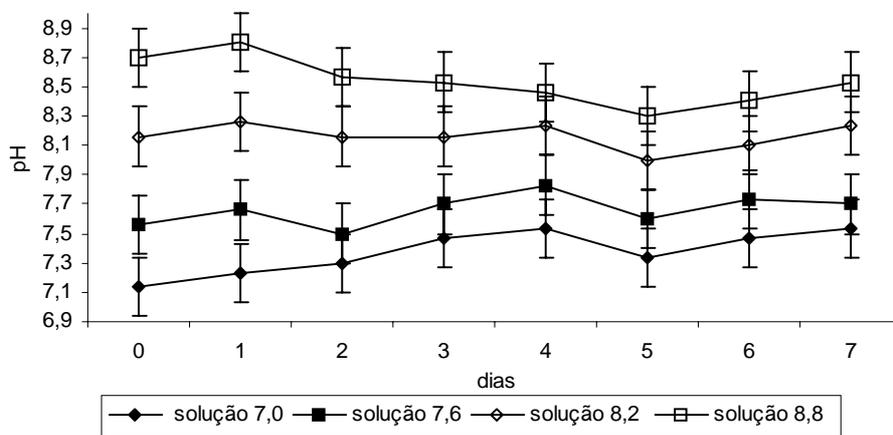


FIGURA 1. Variação média nos valores de pH observados no sêmen de piracanjuba (n=3) diluído em solução de Saad de diferentes pHs, durante resfriamento 4°C-6°C, por 7 dias (Experimento 1).

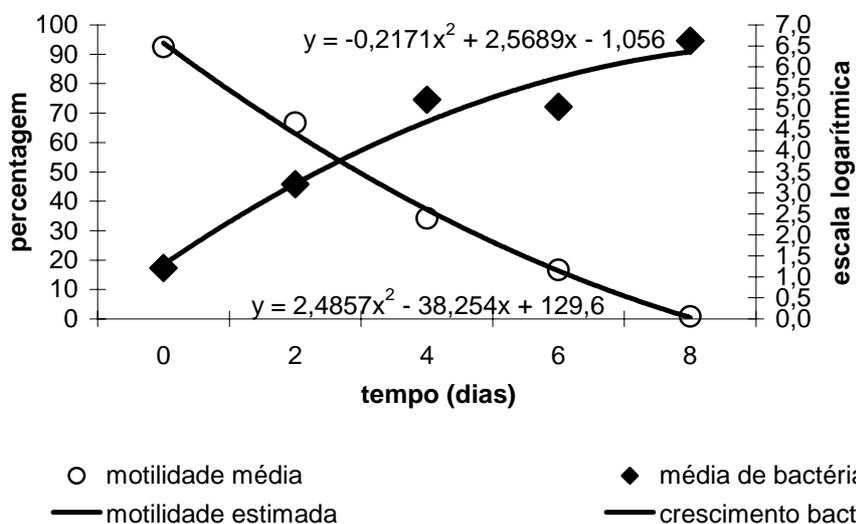


FIGURA 2. Correlação entre motilidade espermática e crescimento bacteriano ($r = -0,76$), em função do tempo em sêmen de piracanjuba (n=6) submetido a resfriamento por 8 dias (Experimento 2).

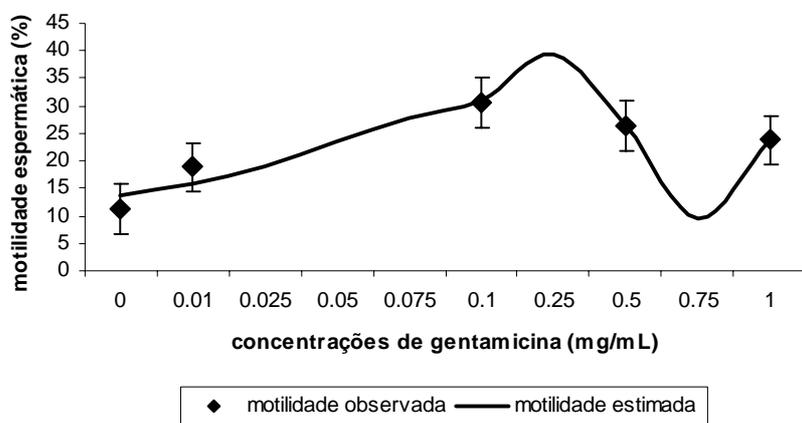


FIGURA 3. Média de motilidade espermática observada e estimada (regressão) para sêmen de piracanjuba (n=8) diluído em solução de Saad em diferentes concentrações de gentamicina, após 6 dias de resfriamento (Experimento 4)
 $\hat{Y} = 375,405866 x^3 - 593,462608 x^2 + 228,040706x + 13,768863$

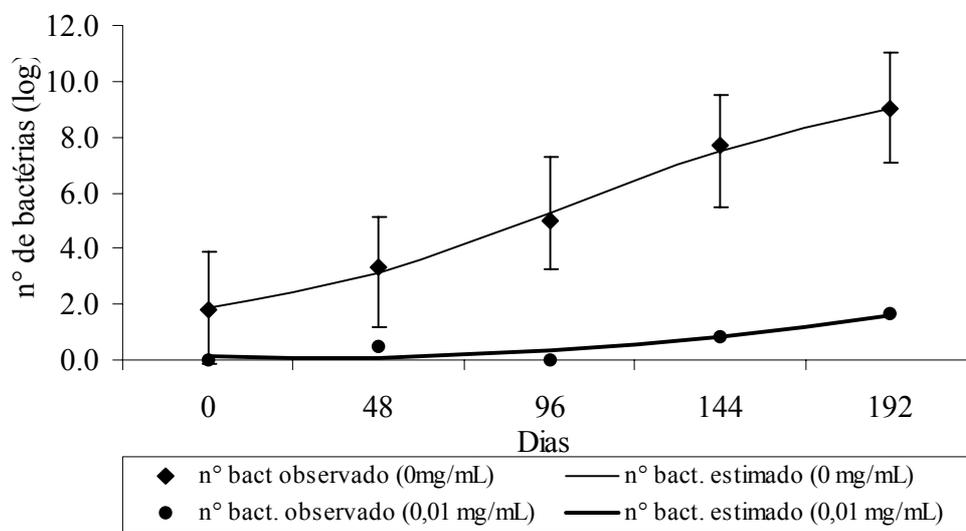


FIGURA 4. Médias de crescimento bacteriano (log) observadas e estimadas, por equação de regressão, em amostras de sêmen de piracanjuba (n=8) diluídas em solução de Saad sem gentamicina (0 mg/mL) e com 0,01 mg/mL de gentamicina, durante o resfriamento por 8 dias. (Experimento 4)