

CARGA BACTERIANA EN SEMEN PORCINO CONSERVADO EN TRES DILUYENTES

R. Navarrete, MG. Orozco, JA. Benítez, C. Lemus y JA. Hernández.

Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Nayarit. A.P No. 88. Compostela. Nayarit, México.
email: namerdsd@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la carga bacteriana en semen porcino conservado en tres diluyentes. Se formaron tres tratamientos (T) con tres repeticiones cada uno, T1 (BTS de corta duración Marca Magapor®) T2 (BTS de larga duración Marca Magapor®) y T3 (MR-A de larga duración Marca Kubus®). Las dosis fueron preparadas con 5000 millones de espermatozoides en un volumen de 100 ml de diluyente y colocadas en una cámara de conservación a 15° C. Se utilizó el medio de cultivo agar de bilis y rojo violeta para la cuenta de microorganismos coliformes totales de vaciado en placa y el medio de cultivo agar nutritivo para la cuenta de microorganismos mesofílicos. El semen se incubó a 35° C y se hizo el conteo a las 24, 48 y 72 horas, las variables analizadas fueron crecimiento de bacterias mesofílicas y coliformes. Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar, a un nivel de significancia del 95% y se establecieron las diferencias entre medias de los tratamientos utilizando prueba de Tukey.

Para bacterias mesofílicas se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$), los valores de contaminación bacteriana se presentaron en el T1 con 120 UFC/mL a las 48 horas y 520 UFC/mL a las 72 horas. Para el crecimiento de bacterias coliformes no se encontró diferencia estadística entre tratamientos ($P > 0.05$).

Se concluye, que el semen almacenado en diluyente de corta duración empleado en programas de inseminación artificial debe utilizarse antes de las 48 horas, ya que a partir de ese momento se incrementa el crecimiento bacteriano, lo cual podría ocasionar alteraciones reproductivas en la cerda.

Palabras claves: cerdos, semen, diluyentes, bacterias, contaminación.

Título corto: Contaminación bacteriana en semen porcino.

BACTERIAL CHARGE IN PORCINE SEMEN PRESERVED IN THREE EXTENDERS

SUMMARY

The objective was to determine the bacterial load in porcine semen preserved in three extenders. Were formed three treatment (T) with three replicates each one, T1 (BTS short extender Magapor®) T2 (BTS long extender Magapor®) and T3 (MR-A long extender Kubus®), doses were prepared with 5000 million sperm and placed in chamber conservation at 15° C. Were used the bile agar culture medium and red violet for the account of total coliforms of emptying in plate and the culture medium nutrient agar for count of mesophilic microorganisms. Incubated at 35° C and the counting were done at 24, 48 and 72 hours. The results were analyzed by analysis of variance under a completely randomized design, at a significance level of 95% and settled differences between treatments using Tukey's test.

For mesophilic bacteria was found statistical difference ($P < 0.05$), the values of bacterial contamination arose in T1 with 120 CFU/ml at 48 hours and 520 CFU/ml at 72 hours. For the growth of coliforms was not found statistically difference among treatments ($P > 0.05$).

It is concluded, that semen stored in short-lived extender used in artificial insemination programs should be used before 48 hours, since from this moment increases bacterial growth, which could result in reproductive alterations in the sows

Key words: pigs, semen, extenders, bacterium, contamination.

Short title: Bacterial contamination in pig semen.

INTRODUCCIÓN

El diluyente para la conservación de semen porcino, es una solución acuosa que sirve para la preservación de la viabilidad espermática y que además de dar volumen al eyaculado para conseguir las dosis necesarias, debe conservar la capacidad fecundante de los espermatozoides durante el mayor tiempo posible. Para que un diluyente pueda cumplir con su función, debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico del espermatozoide, proteger a la célula frente al shock térmico por el frío, controlar el pH del medio, mantener la presión osmótica, así mismo, debe inhibir el desarrollo microbiano (Gadea, 2003; Rocha et al., 2005).

La contaminación bacteriana es una de las causas más comunes de baja calidad de las dosis conservadas por más de tres días, y actualmente se le resta importancia a la contaminación de dosis seminales, por el hecho de considerar que el diluyente siempre contiene antibióticos de amplio espectro; sin embargo, una colección contaminada y un procesamiento inadecuado, pueden resultar en conteos bacterianos altos que se reflejan en resultados pobres en el desempeño reproductivo de las cerdas (Althouse et al., 2000; Pinto et al., 2000).

A pesar de que los diluyentes cuentan con antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano, el semen se puede contaminar como consecuencia de procedimientos higiénicos deficientes durante la colección, evaluación y envasado (Martínez, 2002). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo, fue determinar la carga bacteriana en semen porcino conservado a 15° C en tres diluyentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de biotecnología de la reproducción animal de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit. Se extrajeron tres muestras de semen de un cerdo de raza Yorkshire de dos años de edad, mediante la técnica de mano enguantada. Una vez extraído el semen, se realizaron las evaluaciones macroscópicas: volumen, color, olor, pH y temperatura; y las microscópicas: motilidad, concentración, morfología, relación de espermatozoides vivos y muertos, para determinar si las muestras colectadas reunían las características para ser utilizadas en inseminación artificial (Porras y Flores, 2009).

Se formaron tres tratamientos (T) para determinar el crecimiento de bacterias mesofílicas y coliformes en diluyentes de corta y larga duración, quedando distribuidos de la siguiente manera, T1: Diluyente BTS (Beltsville Thawing Solution) de corta duración (Marca Magapor®), T2: Diluyente BTS de larga duración. (Marca Magapor®), T3: Diluyente MR-A de larga duración (Marca Kubus®).

Una vez evaluado el semen, se prepararon tres dosis, una por cada diluyente con una concentración de 5000 millones de espermatozoides en un volumen de 100 mL de diluyente. Para evaluar el crecimiento de bacterias coliformes se utilizó el medio de cultivo agar de bilis y rojo

violeta, y para bacterias mesofílicas se utilizó agar nutritivo.

Se realizaron tres diluciones con soluciones de trabajo (solución reguladora de fosfato pH 7 ± 0.2 a una temperatura de 25° C) de cada uno de los tres diluyentes recién preparados, para posteriormente inocular en dos cajas de Petri 1 ml de muestra de cada dilución y enseguida se le agregó el medio de cultivo correspondiente para cada uno (según la NOM 092 y NOM 113 para determinación de bacterias mesofílicas y coliformes, respectivamente), se incubó a 35° C por 24 horas para posteriormente proceder a leer las muestras y realizar el conteo a las 24, 48 y 72 horas.

Las variables evaluadas fueron crecimiento de bacterias mesofílicas y coliformes, las cuales se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza, bajo un diseño completamente al azar, a un nivel de significancia del 95% y se establecieron las diferencias entre medias para tratamientos mediante la prueba de Tukey (Herrera y García., 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados obtenidos para bacterias mesofílicas mostraron diferencia estadística ($P < 0.05$, tabla 1), los valores de contaminación bacteriana con Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se presentaron en el T1; con crecimiento bacteriano a partir de las 48 horas de siembra con 120 UFC/ml y a las 72 horas el crecimiento se incrementó a 540 UFC/ml. Para T2 y T3, no existió crecimiento bacteriano (UFC) durante las horas de siembra (24, 48 y 72 horas).

Tabla 1. Resultados por tratamiento a las 24, 48 y 72 horas de siembra para bacterias mesofílicas

Tratamiento	ufc/ml		
	24	48	72
T1: BTS (cd)	0	120 ^b	540 ^c
T2: BTS (ld)	0	0 ^a	0 ^a
T3: MR-A (ld)	0	0 ^a	0 ^a

^{abc} Literales distintas indican diferencia estadística para $P < 0.05$

ufc: unidades formadoras de colonias

cd: corta duración

ld: larga duración

Los resultados obtenidos no coinciden con lo que reportaron González y colaboradores (2009), quienes al hacer aislamiento e identificación bacteriana en dosis seminales mantenidas en diluyentes de larga duración (MR-A® y XT-R®), encontraron presencia de *Klebsiella* spp, *Klebsiella* aerógenos y *Proteus* spp desde las 24 horas de siembra.

Al respecto, Rocha y colaboradores (2004), mencionan que el tipo de bacteria no es tan importante, sino la cantidad de UFC encontradas en una muestra, por lo que lo ideal es no encontrar crecimiento después de las primeras 48 horas de incubación a 37° C

Con base en el resultado obtenido en el tratamiento de corta duración (T1), se cuestiona la utilización de una dosis de semen conservado por 72 horas, mantenida en un diluyente de estas características, ya que durante este tiempo de conservación se presentó contaminación bacteriana, lo cual podría comprometer la fertilidad de la cerda. Para el crecimiento de bacterias coliformes, no se encontró diferencia estadística entre tratamientos ($P > 0.05$, tabla 2).

Tabla 2. Resultados por tratamiento a las 24, 48 y 72 horas de siembra para bacterias coliformes

Tratamiento	ufc/ml		
	24	48	72
T1: BTS (cd)	0 ^a	0 ^a	0 ^a
T2: BTS (ld)	0 ^a	0 ^a	0 ^a
T3: MR-A (ld)	0 ^a	0 ^a	0 ^a

^a Literales iguales por columna no existe diferencia estadística para $P > 0.05$.

ufc: unidades formadoras de colonias

cd: corta duración

ld: larga duración

En el resultado obtenido en los diferentes tratamientos y durante las horas de siembra no se encontró crecimiento bacteriano, el resultado de esta investigación no coincide con lo que reportan Araúzo y Echegaray (2003), quienes mencionan que el aparato reproductor del cerdo, en especial el divertículo prepucial es rico en bacterias, por ello durante la colección de semen se puede producir una contaminación bacteriana de origen fecal (bacterias coliformes), principalmente si existe falta de higiene, lo cual puede dar como consecuencia una contaminación de las dosis.

Martínez (2002), menciona que los eyaculados de cerdo siempre tienen cierta carga bacteriana, en su estudio concluyó que el semen normalmente puede tener de 8 a 10 mil UFC/ml, y las bacterias que con más frecuencia se encuentran en los eyaculados, son: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter suis*, *Klebsiella* spp y *Citrobacter* spp. Althouse (2005), señala que es de gran importancia el elegir el diluyente para la conservación de semen, no solo por su duración sino por la diversidad de antibióticos que pueda contener para favorecer la supervivencia espermática, de lo contrario la bacteriospermia afecta la calidad y longevidad de los espermatozoides.

Así mismo, se ha demostrado que la presencia de endotoxinas de algunas bacterias tienen efectos detrimentales como disminución del pH, alteraciones de la estructura y funciones de la membrana espermática, además de la competencia por los nutrientes que aporta el diluyente (Almond, 2001). En conclusión, se sugiere realizar la inseminación artificial con semen mantenido en diluyente de corta duración antes de las 48 horas de almacenamiento, ya que a partir de este momento se presentó crecimiento bacteriano.

REFERENCIAS

Almond, G., and Poolperm, P. 2001. Semen contamination and choosing antibiotics. North Carolina State University. EUA.

Althouse, G.C., Kuster, C.E., Clark, S.G., and Weisiger, R.M. 2000. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*. 53(5): 1167 – 1176.

Althouse, G.C. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*. 53: 1167 – 1176.

Araúzo, F., y Echegaray, A. 2003. Contaminación bacteriana en el semen porcino. Los porcuicultores y su entorno. 36: 36 – 42.

Gadea, M.J. 2003. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2: 17 – 27.

González, A., Espinosa, S., Ramírez, G., y Galván E. 2009. Aislamiento e identificación bacteriana de dosis seminales de verraco utilizando diluyentes de larga duración XT-R y MR-A. XLIV Congreso nacional AMVEC. Puerto Vallarta, Jalisco. México. Pg 239.

Herrera, H.J.G., y García, A.C. 2011. Bioestadística en Ciencias Veterinarias (Procedimientos de análisis de datos con SAS). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México y Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. Madrid, España.

Martínez, R.R. 2002. Aspectos prácticos de higiene en la inseminación artificial. Los porcuicultores y su entorno. 28: 25 – 34.

Norma oficial mexicana nom-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Norma oficial mexicana nom-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Porras, A.A., y Flores, G.H. 2009. Manejo reproductivo de porcinos. Manual de prácticas de reproducción animal. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, D.F. Páginas 183 – 187.

Rocha, Ch.G., Becerril, A.J., Téllez, G.B.H., y Rodríguez, A.M. 2004. Preguntas más frecuentes y sus respuestas, durante las auditorías sobre reproducción porcina. XXXIX Congreso nacional AMVEC. Mazatlán, Sinaloa. México. Pg. 132 – 145.

Rocha, Ch.G., Mercado, A.J., Pinal, S.L., y Valdovinos, R.O. 2005. Uso de diluyentes hiperproteicos para diluir semen de cerdo. ¿en realidad valen la pena?. XL congreso nacional AMVEC (Memorias). León, Guanajuato. México. Página 255.

Pinto, M.M.V., Ramalho, S., Perestrelo, Vielra, R., and Rodrigues, J. 2000. Microbiological profile of pure semen and seminal doses of boars used in artificial insemination. *Veterinaria Técnica*. 10(3): 24 – 28.