

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS TRATAMIENTOS CON ANTIBIÓTICOS SOBRE LA CALIDAD BACTERIOLÓGICA Y ESPERMÁTICA DEL SEMEN BOVINO

Luis Emilio Trujillo A¹.; Magda Rivera R².

RESUMEN

Para investigar el efecto antibacteriano y sobre la calidad del semen bovino se aplicaron dos tratamientos con antibióticos al diluyente de conservación. Una terapia consideró el uso de una nueva combinación de antibióticos (100 µg/ml de tilosina, 500 µg/ml de gentamicina, 300 µg/ml de lincomicina y 600 µg/ml de espectinomicina) y la otra utilizó la combinación tradicional de 1000 UI/ml de penicilina y 1 µg/ml de sulfato de estreptomicina. La investigación se realizó en el Laboratorio de Procesamiento de Semen de San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín bajo condiciones bioclimáticas correspondientes a una zona de vida de bosque húmedo montano bajo (bh-MB). El semen recibió el tratamiento antibiótico en la fracción A del diluyente a una temperatura de 32°C y se le permitió interactuar por espacio de 10 minutos antes de darse inicio al descenso de la temperatura hasta 5°C, momento en el cual se adicionó la fracción B del diluyente con el crioprotector, se estabilizó durante tres horas y se congeló en pajillas francesas de 0,5 ml. Para efecto de la evaluación del crecimiento bacterial e identificación de las colonias las muestras fueron sometidas a cultivo y aislamiento en agar sangre y agar MacConkey. La calidad seminal se evaluó por el porcentaje de espermias móviles, porcentaje de espermias vivos y morfología espermática. El efecto de los tratamientos se analizó por análisis de varianza y los promedios fueron comparados por la prueba de los rangos múltiples de Duncan. El 62,5% de las muestras presentaron contaminación bacteriana por Escherichia coli, Proteus spp o Klebsiella spp y el promedio de unidades formadoras de colonias (UFC) en las muestras contaminadas fue de 6,416 UFC/ml de semen, variando entre cero (0) y 30.000. Los dos tratamientos con antibióticos ejercieron un efecto bactericida que permaneció durante el

¹ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779.

² Médica Veterinaria. Zootecnista. Biotecnología en Reproducción Animal. Medellín.

proceso de congelación y descongelación del semen. No se presentaron efectos de los tratamientos sobre las características movilidad, vitalidad y morfología espermáticas.

Palabras clave: bacteriología, espermatozoide, microorganismo, morfología, movilidad, toro.

ABSTRACT

Comparative study of two treatments with antibiotics on the bacteriological and spermatic quality of the bovine semen

Two antibiotic treatments were added to the conservation extender in order to search the antibiotic effect and upon the quality of the bovine semen. One therapy used a combination of new antibiotics (100 g/ml tylosin, 500 g/ml gentamicin, 300 g/ml lyncomycin and 600 g/ml spectinomycin), the other therapy used a traditional combination of 1.000 UI/ml of penicillin and 1 g/ml streptomycin sulfate. The research was carried out at the Laboratory of Semen Processing San Pablo of the Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín with bioclimate conditions correspondent to an area classified as humid forest low montano (bh-MB). The semen received the antibiotic treatment in the A extender fraction to 32°C of temperature, and it was allowed to interact for 10 minutes before to start lowering the temperature until 5°C, at this moment the fraction of the extender with the crioprotector was added, left stabilizing during three hours and then frozen in French straws of 0,5 ml. Samples were subjected to culture and isolation in blood and McConkey agar in order to evaluate bacterial growth and identification of colonies. Seminal quality was evaluated by spermatozoa motility percentage, alive spermatozoa percentage and spermatozoa morphology. The effect of the treatments was analyzed by variance analysis and averages were compared by the multiple ranges test of Duncan. The samples showed bacterial contamination by Escherichia coli, Proteus spp. Or Klebsiella spp. In 62,5% and the forming colonies units averaged 6.416 UFC/ml of semen in the sample pool, ranged among zero and 30.000. Both antibiotic therapies executed a germicide effect that remained through freezing and thawing process of the semen. None antibiotic therapy effects were presented on spermatozoa motility, livability or morphology.

Key words: bacteriology, bull, microorganism, morphology, motility, sperm.

INTRODUCCIÓN

Bajo las exigencias sanitarias vigentes, los toros donantes de semen deben estar libres de entidades infecciosas específicas transmisibles a través del semen como lo

son la brucelosis, leptospirosis, campilo-bacteriosis, rinotraqueitis bovina infecciosa, diarrea viral bovina, tuber-culosis y leucosis bovina infecciosa; sin embargo, otros microorganismos no específicos procedentes del prepucio, piel o del ambiente pueden entrar en contacto con el semen y contaminarlo en el momento de la recolección o durante el procesamiento para la congelación. En la práctica de la inseminación artificial se han adoptado varios procedimientos con el fin de evitar la presencia de estos microorganismos contaminantes en el semen. Estos procedimientos se fundamentan en una buena higiene y desinfección rigurosa de los toros antes de la recolección; pero, infortunadamente, estas prácticas de manejo han sido poco eficaces para controlar la presencia de los micro-organismos contaminantes, haciendo necesaria la adición de antibióticos en los diluyentes para la conservación del semen. La contaminación bacteriana del semen y sus efectos asociados sobre la fertilidad han llevado al uso de una combinación de penicilina y estreptomina en los diluyentes, sin causar daños en la viabilidad de los espermas. No obstante, en los últimos años han surgido dudas sobre la efectividad de estos antibióticos en el control bacteriano, hay cierta restricción comercial para las presentaciones individuales de penicilina sódica y de dihidroestreptomina cristalina y paralelamente, se han desarrollado nuevos antibióticos activos contra bacterias gram-positivas y gram-negativas que se

consideran promisorios como agentes antibacterianos en el semen. Estos últimos incluyen polimixina, neomicina, tilosina, gentamicina, lincomicina y espectinomina que aunque relativamente inofensivos para la movilidad de los espermas del bovino muestran tasas de no retorno más bajas que la penicilina-estreptomina.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antibacteriano y sobre la calidad del semen de dos terapias antibióticas en el Laboratorio de Procesamiento de Semen San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, siguiendo un protocolo de congelación que considera el uso de toros donantes libres de enfermedades específicas de la reproducción. Una terapia consideró el uso de una nueva combinación de antibióticos (tilosina, gentamicina, lincomicina y espectinomina) según las regulaciones internacionales de semen certificado y la otra utilizó la combinación tradicional de penicilinas (penicilina G sódica y procaínica) y sulfato de estreptomina, acorde a una presentación comercial disponible en Colombia por laboratorios California. Esta investigación se desarrolló dentro de un marco conceptual que busca ofrecer a los hatos bovinos colombianos un material seminal que garantice las más altas tasas de fertilidad para poder subsistir dentro de un mercado altamente competitivo planeado a partir de la economía abierta y que la aplicación exitosa de la inseminación artificial

requiere de un estándar de procesamiento del semen en compromiso con la calidad, especialmente bacteriológica.

El semen se ha considerado un buen medio para el crecimiento bacterial y probablemente, el primer reporte de contaminación bacteriana del semen lo realizó Spallanzani (1785), citado por Gunsalus, Salisbury y Willett (1941), quien observó que el semen de un sapo terrestre se descomponía rápidamente. Él atribuyó la disminución de la fertilidad del semen a esta putrefacción. Posteriormente Roemmele (1927) citado por Gunsalus, Salisbury y Willett (1941), notó la presencia de bacterias en semen almacenado a temperatura ambiente y a 9°C, y le atribuyó la muerte de los espermias a la acumulación de los productos metabólicos de las bacterias. Para esta misma época, Krzyzkowsky y Pawlow (1927) citados por Gunsalus, Salisbury y Willett (1941) (1941) observaron bacterias que crecían rápidamente en el semen, especialmente un bacilo móvil pequeño que formaba un pigmento verde azul (probablemente *Pseudomona pyocyaneus*) y aunque no tuvieron evidencias definitivas que indicaran un efecto detrimento de esta bacteria sobre el semen, pensaron que los productos del metabolismo bacteriano afectaban la vida de los espermatozoides.

Los microorganismos identificados más recientemente en el semen de toros son extremadamente variables e incluyen *Corynebacterium renale*, *Leptospira spp*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium*

REVISIÓN DE LITERATURA

pyo-genes, *Brucela abortus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium paratu-berculosis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus spp*, *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*, bacilos y mohos (Cottrino 1976; Roberts 1979; Martinez. 1986, 1987; Napoles *et al*, 1987). Albertsen (1955), citado por Roberts (1979) encontró micoplasma en el 94% de las muestras de semen de toros y estableció que este microorganismo es un saprófito en el prepucio de casi todos los toros.

La contaminación bacteriana del eyaculado en toros clínicamente sanos usados como donantes de semen puede ser debida a la flora microbiana normal de la uretra y el prepucio (Varner *et al*, 1998). Esta flora puede afectar directamente la calidad del semen o inducir procesos inflamatorios en el tracto genital de la hembra (Maule y Hu, 1962 citados por Holzmann, Laber y Gumhold (1984). Cuando la flora normal es alterada, bacterias potencialmente patógenas (por ejemplo *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsella pneumoniae*) pueden colonizar el pene y el prepucio. (Hugges, Asbury, Loy y Burd, 1967; citados por Varner *et al*; Johnson *et al* 1980 citados por Varner *et al*; Merkt *et al*, 1975 citados por Varner *et al*, 1998). Desde las observaciones de Lucet (1893) citado por Gunsalus, Salisbury y Willett (1941), se han implicado a estas bacterias como agentes

responsables de metritis, cervicitis, esterilidad y aborto de las vacas.

La presencia de microorganismos del grupo coliforme es el resultado de la contaminación fecal del semen al

Algunos tipos específicos de bacterias han sido relacionados con la fertilidad en toros. Prince *et al* (1949) confirmaron la presencia de *Pseudomona aeruginosa* en muestras de semen, y aunque su número relativamente grande no se relacionó con el nivel de fertilidad, su presencia pudo estar asociada con casos individuales de infertilidad. Las muestras de semen se caracterizaron por tener un bajo porcentaje de espermatozoides y un alto porcentaje de células morfológicamente anormales. Según Boryczko (1982) citado por Martínez, Salisbury, y Willett (1987) este microorganismo tiene un papel sobre los espermatozoides y la fertilidad de la hembra bovina aun discutible; sin embargo, se obtienen resultados de pérdida de movilidad, reducción en la fecundidad y muerte embrionaria por el uso de semen contaminado con este microorganismo.

También hay evidencias de que ciertas bacterias pueden producir toxinas y productos metabólicos nocivos para la viabilidad del semen. Uchigaki (1930), citado por Prince *et al* (1949); Ognianov (1947) citado por Prince *et al* (1949); Edmondson, Tallman y Herman (1948) y Marinov (1967) citado por Martínez, (1987) reportaron un efecto marcadamente deletéreo de la toxina de *E. coli*

momento de la recolección más que de la eliminación de los microorganismos desde el tracto reproductivo del toro al momento de la eyaculación (Prince *et al*, 1949).

relacionado con aglutinación de los espermatozoides y disminución de la movilidad espermática durante el proceso de almacenamiento del semen en refrigeración, pero no encontraron relación significativa entre la presencia de los microorganismos coliformes en el semen y la fertilidad.

Existe la posibilidad de que la capacidad fertilizante de cualquier muestra de semen pueda estar afectada por el número de bacterias presentes. El recuento bacterial de las muestras de semen recolectadas por medio de la vagina artificial varía desde 1.000 hasta 22.000.000 de bacterias/ml (Gunsalus, Salisbury, y Willett, 1941). Sin embargo, Almquist, Glantz y Thorp (1948) reportaron recuentos bacteriales más bajos variando desde 100 hasta 960.000 bacterias/ml con un promedio de 200 microorganismos/ml, encontrando diferencias marcadas en las muestras de diferentes toros y entre varios eyaculados del mismo toro.

Los promedios de los recuentos bacterianos en años más recientes han permanecido en los rangos establecidos anteriormente aunque se han aplicado soluciones desinfectantes buscando disminuir la contaminación bacteriana en prepucio y semen. Martínez, Peraza, y

García (1985, 1986) reportaron valores promedios de 105.962 microorganismos /ml en semen fresco.

Almquist, Glantz, y Thorp (1949) notaron que el recuento promedio más bajo de bacterias estuvo asociado con un nivel bajo de fertilidad y el recuento bacteriano más alto fue obtenido de toros con un nivel alto de fertilidad. Estas

A partir de las evaluaciones realizadas por Jones (1958), citado por Lorton *et al* (1988); Elliott, Murphy y Bartlett (1961) citados por Ericsson *et al* (1988) y Sullivan *et al* (1966), la industria de la inseminación artificial bovina recurrió a la adición de los antibióticos penicilina, dehidroestreptomomicina y polimixina B sulfato durante el procesamiento del semen para congelación. Estos antibióticos se consideraron efectivos para controlar *Campylobacter fetus* y *Leptospira pomona* y probablemente otros microorganismos potencialmente presentes en el semen bovino. Sin embargo, Hirth, Plasteridge y Tourtellotte (1967) citados por Holzmann, Laber y Gumhold (1984), reportaron poca eficiencia de esta combinación antibiótica para eliminar el micoplasma del semen bovino y por esta razón se ensayaron posteriormente varios complejos antibióticos en eyaculados bovinos contaminados natural o artificialmente con especies de micoplasma y ureaplasma. Estos ensayos le confirieron propiedades antimicoplasmáticas y ureaplasma a la lincomicina y a la espectinomomicina y fueron introducidos en muchos centros de inseminación artificial desde 1971 (Hamdy y Miller 1971).

diferencias parecen ser de magnitud insuficiente para indicar cualquier relación significativa entre la fertilidad y el recuento bacteriano del semen. No obstante aun permanece la posibilidad de que la capacidad fertilizante de cualquier muestra de semen puede estar afectada por el número de bacterias presentes.

Shin, Lein y Patten (1988) demostraron la efectividad de la tilosina, gentamicina y lincoespectin sobre *Campylobacter fetus*, *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma spp.*, y *Ureaplasma spp.* potencialmente presentes en el semen bovino. Lorton *et al* (1988) señalaron que esta combinación de antibióticos no era deletérea para la calidad del semen determinada por la movilidad progresiva y la integridad acrosómica posdescongelación. Los mismos autores no encontraron diferencias estadísticas significativas entre vacas inseminadas con semen procesado bajo este régimen de antibióticos y aquellas vacas inseminadas con semen tratado con penicilina, estreptomomicina, polimixina y lincoespectin. No obstante lo anterior, recientemente Visser, Aak y Jansen (1999) concluyeron que la mezcla antibiótica compuesta por la tilosina, gentamicina, lincomicina y espectinomomicina era incapaz de eliminar totalmente la contaminación por micoplasmas en el semen bovino congelado.

No hay evidencias que permitan concluir una mejoría de la fertilidad de toros sanos mediante el uso de diluyentes

tratados con antibióticos. Blanchard (1987) lograron mejorar la fertilidad de un caballo con vesiculitis seminal relacionada con *Pseudomona aeruginosa*, usando un diluyente con 1.000 unidades/ml de polimixina B. Este hallazgo se ha validado para mejorar la fertilidad de yeguas con historias de infecciones uterinas recurrentes postservicio. Según los mismos autores, la fertilidad también puede ser mejorada en yeguas normales mediante el control de bacterias

Localización. Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Procesamiento de Semen San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, ubicado en la vereda Tablacito del municipio de Rionegro (Antioquia) a una altura de 2.100 m.s.n.m, una temperatura entre 18 y 24 °C, y una precipitación anual de 2.000mm; condiciones bioclimáticas correspondientes a una zona de vida de bosque húmedo montano bajo (Espinal, 1977).

Recolección y manejo del semen. Se recolectaron 16 eyaculados de dos toros Holstein por el método de vagina artificial que fueron llevados inmediatamente al laboratorio para someterlos a evaluación y posterior congelación. Se consideraron materiales seminales aptos para la congelación aquellos que contenían un mínimo de 700 millones de espermatozoides/ml y 70% de movilidad individual. Cada eyaculado se dividió en dos alícuotas iguales que se diluyeron en tris-yema adicionado con la respectiva terapia antibiótica hasta alcanzar una

potencialmente patógenas en el semen. El incremento en la fertilidad puede ser por la influencia benéfica del antibiótico sobre la habilidad fertilizante del semen o indirectamente por prevención de una endometritis transitoria aguda que pudiera causar mortalidad embrionaria temprana.

MATERIALES Y MÉTODOS

concentración final de 80 millones de espermatozoides por centímetro cúbico de diluyente.

Tratamientos antibióticos. El tratamiento de prueba utilizó una combinación de antibióticos de nueva generación con 100_g de tilosina, 500_g de gentamicina, 300_g de lincomicina y 600_g de espectinomicina por centímetro cúbico del diluyente total, según las regulaciones internacionales de semen certificado (Doak, 1986 citado por Ericsson, 1990). El tratamiento control utilizó una mezcla de 1.000 UI de penicilina y 1_g de estreptomina por centímetro cúbico de diluyente total, acorde a una presentación comercial disponible en Colombia por Laboratorios California (SAVAC[®]).

Cada alícuota de semen recibió el respectivo tratamiento en la fracción A del diluyente a una temperatura de 32°C y se dejaron interactuar por espacio de 10 minutos antes de darse inicio al descenso de la temperatura hasta 5°C, momento en

el cual se adicionó la fracción B del diluyente con el crioprotector.

El semen diluido fue estabilizado durante tres horas, aspirado en pajillas francesas de 0,5 ml, selladas y congeladas en vapores de nitrógeno líquido a una tasa de 6,0°C/min desde los 5°C hasta -9°C, 4°C/min desde -9°C hasta -36°C y 10°C/min hasta -100°C.

Las pajillas fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta el momento de la descongelación para su evaluación.

Evaluación de los tratamientos antibióticos.

La evaluación de los tratamientos se realizó con base en el

La calidad seminal se evaluó por el porcentaje de espermias móviles estimado mediante el promedio de la observación subjetiva de tres técnicos a partir de un preparado con 3 μ l de material seminal extendido sobre una lámina de vidrio temperada, cubierta con una laminilla (Ahmad y Foote, 1985). También se realizaron extendidos de semen teñidos con eosina nigrosina modificada para evaluar la vitalidad y la morfología espermática según la técnica descrita por Barth y Oko, (1989). El pH se estimó con una tirilla Neutralit (Merck) para pH impregnada con material seminal y se valoró en una escala de 5 a 10 con variaciones de 0,5 unidades.

crecimiento bacterial y calidad del semen.

Para tal efecto se recolectaron muestras del semen fresco, del semen diluido precongelación y del semen postdescongelación.

Para la evaluación del crecimiento bacterial, las muestras fueron sometidas a cultivo y aislamiento en agar sangre y agar MacConkey en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Las colonias bacterianas fueron identificadas utilizando criterios estándar (Dowell y Hawkins, 1977; Lennette Spaulding y Truant, 1985 citados por Varner *et al*, 1998).

- Recuento bacteriológico (UFC) e identificación de colonias.

VARIABLES RESPUESTA

- Porcentaje de movilidad individual.
- Porcentaje de espermatozoides normales.
- Porcentaje de espermatozoides anormales.
- pH.

de varianza y los promedios de los tratamientos fueron comparados por la prueba de los rangos múltiples de Duncan (Statgraphics, 1985).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El efecto de los tratamientos sobre movilidad individual, espermatozoides normales y espermatozoides anormales se analizó por análisis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 presenta los recuentos bacteriológicos y los valores de pH para muestras de semen fresco.

Tabla 1. Valores de pH, recuento e identificación de bacterias en semen bovino.

Número de la muestra	Valor de pH	Unidades formadoras de colonias/ml de semen			Agente bacterial		
		Fresco	Diluido	Post congelación	Fresco	Diluido	Post congelación
1	6,7	30	0	0	<i>E coli</i>		
2	6,6	30	0	0	<i>E coli</i>		
3	6,7	1.100	0	0	<i>E coli</i>		
4	7,0	1.000	0	0	<i>E coli</i>		
5	6,6	10.000	0	0	<i>Proteus</i>		
6	6,8	10.000	0	0	<i>E coli</i>		
7	6,9	1.000	0	0	<i>E coli</i>		
8	6,6	0	0	0			
9	6,8	1.000	0	0	<i>E coli</i>		
10	6,8	0	0	0			
11	6,5	0	0	0			
12	6,7	10.000	0	0	<i>E coli</i>		
13	6,5	30.000	0	0	<i>Klebsiella</i>		
14	6,6	0	0	0			
15	6,7	0	0	0			
16	6,6	0	0	0			

De 16 muestras de semen fresco a las cuales se les realizó cultivo bacteriológico, diez muestras (62.5%) presentaron contaminación bacteriana por *Escherichia coli*, *Proteus* spp o *Lebsiella* spp. A pesar del hallazgo de estos microorganismos, se considera como aspecto favorable en esta investigación la ausencia de otras bacterias como

Streptococcus spp, *Staphylococcus* spp, *Corynebacterium* spp, *Mycobacterium* spp y *Pseudomona* spp asociadas con cambios metabólicos en el semen que afectan la calidad espermática o relacionadas con un efecto adverso sobre la fertilidad y muerte embrionaria (Martínez, 1987).

Cincuenta por ciento (50%) de las muestras resultaron positivas a *Escherichia coli* como consecuencia de la contaminación ambiental o por la posible presencia de la bacteria en las vesículas seminales de los toros, desde donde es evacuada durante la eyaculación. Es probable que la bacteria esté comprometida en procesos inflamatorios de las vesículas seminales en toros donantes recolectados con vagina artificial; una condición semejante a la reportada por Bradley y Greent (2000) en vacas lecheras que sufren mastitis clínica al inicio de la lactancia, debido a la presencia de enterobacterias en los cuartos infectados previamente durante el período seco y no provenientes del medio ambiente.

En futuras investigaciones será necesario explorar la presencia de enterobacterias residentes en el tracto reproductivo de los toros, mediante la aplicación de técnicas genéticas que permitan identificar las cepas bacterianas y precisar si se trata de habitantes permanentes del tracto reproductivo de los machos o si por el contrario son

La variación en el número de UFC/ml es explicable por las condiciones higiénicas y sanitarias de los toros al momento de la recolección y por las condiciones ambientales bajo las cuales se realizó la recolección del semen. Algunos autores han asociado el recuento bacterial con las estaciones climáticas; Runceanu *et al* (1973) citados por Martínez (1987), reportaron un mayor

contaminantes provenientes de la materia fecal, del medio ambiente o de los instrumentos y equipos utilizados durante la recolección del semen.

El promedio de unidades formadoras de colonias (UFC) en las muestras contaminadas de esta investigación fue de 6.416 UFC/ml de semen, variando entre (0) y 30.000. Este valor es inferior a 105.962 UFC/ml halladas por Martínez, Peraza y Garcia (1985), después del uso de algunas soluciones desinfectantes aplicadas sobre el pene, prepucio y piel de los toros con el objeto de disminuir la cantidad de microorganismos presentes en el semen. Esto sugiere la imposibilidad para controlar los microorganismos del semen a través del uso de desinfectantes locales y refuerza la sospecha de que algunas de estas bacterias pueden ser residentes permanentes del tracto reproductivo interno de los toros.

promedio de microorganismos en el semen fresco durante los meses de otoño que durante los meses de primavera.

Se encontró una asociación negativa (-0,30), no significativa ($P=0,25$), entre el pH y el número de UFC en el semen fresco. A pesar del nivel de significancia debido al reducido número de muestras, la asociación de estas variables es de

importancia, ya que a medida que se aumenta el número de microorganismos en la muestra se incrementa la demanda sobre los nutrientes presentes en el semen fresco, en una vía metabólica que conduce a la formación y liberación de ácidos que bajan el pH del medio, afectando desfavorablemente la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides, quienes a su vez compiten con las bacterias por los nutrientes presentes en un medio cada vez más escaso.

La dilución e interacción del semen con ambas terapias de antibióticos adi-

cionadas al diluyente durante diez minutos a temperatura ambiente, ejerció un efecto bactericida que permaneció durante del proceso de congelación y descongelación del semen. Como resultado se puede afirmar que estos antibióticos son de utilidad para la congelación de semen bajo las condiciones del Laboratorio de Procesamiento de Semen San Pablo.

En el futuro será importante investigar la posibilidad de utilizar concentraciones antibióticas más bajas y establecer los efectos sobre otros microorganismos como *Micoplasmas* y *Ureoplasmas* no considerados en este estudio y cuya sensibilidad o resistencia a los antibióticos está en discusión por muchos autores (Shin, Lein y Patten, 1988).

La Tabla 2 presenta el análisis de varianza por efecto del tratamiento para las características seminales.

Tabla 2. Análisis de varianza para las características seminales según el efecto del tratamiento de terapia antibiótica.

Característica	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Valor P
Movilidad Individual	1	855,5	855,5	2,26	0,13
Espermas Normales	1	0,14	0,14	0,00	0,96
Espermas anormales	1	0,14	0,14	0,00	0,96

No se presentaron efectos de la terapia antibiótica sobre las características

movilidad y morfología espermáticas posdescongelación. Este resultado

concuera con el estudio de Ericsson *et al* (1990) quienes evaluaron por citometría, la morfología de espermatozoides bovinos congelados tratados con penicilina estreptomycinica y la combinación tilosina, gentamicina y lincoespectina como en el presente estudio y no encontraron diferencias

significativas en las fluorescencias de las poblaciones de espermatozoides bajo las dos terapias antibióticas.

En la Tabla 3 se presentan los promedios, error estándar y límites inferior y superior para las variables movilidad individual, espermatozoides normales y espermatozoides anormales pos-descongelación según la terapia antibiótica utilizada.

Tabla 3. Promedios, error estándar y límites de confianza para las características seminales pos-descongelación de eyaculados bovinos sometidos a dos terapias con antibióticos.

Parámetro	Control			Tratamiento		
	Movilidad Individual	Espermas Normales	Espermas anormales	Movilidad Individual	Espermas Normales	Espermas anormales
n.	32	32	32	32	32	32
Promedio	54,2	80,5	19,5	46,9	80,4	19,6
Error estándar	3,5	1,4	1,4	3,5	1,4	1,4
Limite Inferior	47,3	77,6	16,6	40,0	77,5	16,7
Limite Superior	61,2	83,4	22,4	53,8	83,3	22,5

Control: Penicilina, estreptomycinica.

Tratamiento: Tilosina, gentamicina, lincomicina y espectinomycinica

A pesar de que no se encontraron efectos significativos de los tratamientos sobre las características seminales, se observó una tendencia hacia una mejor movilidad individual (54,2%) en el grupo control constituido por los antibióticos penicilina y estreptomycinica comparado con el grupo tratado (46,9%) con la

combinación de los nuevos antibióticos. Varner *et al* (1998) reportaron que la penicilina es el antibiótico que menos afecta la movilidad espermática en comparación con otros antibióticos usados en congelación y recomiendan su uso en los diluyentes de semen con propósitos comerciales.

CONCLUSIONES

En los cultivos bacteriológicos del semen fresco de esta investigación se detectó la presencia de *Escherichia coli*, *Proteus* spp y *Klebsiella* spp con recuentos inferiores a los reportados por la literatura.

La mitad de estas muestras resultaron positivas a *Escherichia coli* como consecuencia de la contaminación ambiental o por la posible presencia de la bacteria en las vesículas seminales de los toros.

Ambas terapias de antibióticos adicionadas al diluyente durante diez minutos a temperatura ambiente ejercieron un adecuado efecto bactericida sobre los gérmenes aislados en el semen, que se prolongó durante el proceso de congelación y descongelación, sin detrimento de las características de movilidad individual y morfología espermática.

Un aspecto favorable en esta investigación fue la ausencia de otras bacterias como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas* que han sido asociadas con cambios metabólicos en el semen o con pérdida de fertilidad y muerte embrionaria.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Laboratorio de

Procesamiento de Semen San Pablo, Departamento de Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por el apoyo económico y el suministro de equipos y reactivos para la realización de la investigación. A Laboratorios California por el suministro del antibiótico SAVAC® y muy especialmente al doctor Hemerson Moncada A. Por la revisión del informe final.

BIBLIOGRAFÍA

AHMAD, K., and FOOTE, R.H. Motility and fertility of frozen bull spermatozoa in tris-yolk and milk extenders containing amikacin sulfate. *Err: Journal of Dairy Science*. Vol. 68 (1985); p.2083-2086.

ALBERTSEN, B.E. Pleuropneumonia-like organisms in the semen of Danish artificial insemination bulls. *Err: Nord. Vet. Med.* Vol. 7, No.3 (1955); p.169. Citado por ROBERTS, S.J. Obstetricia veterinaria y patología de la reproducción. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur, 1979. p.989.

ALMQUIST, J.O., GLANTZ, P.J., and THORP, W.T.S. The effect of streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen. *Err: Journal of Dairy Science*. Vol. 31 (1948); p. 501-507.

ALMQUIST, J.O., PRINCE, P.W., and REID, J.J. Bacteriological studies of bovine semen. I. Numbers of bacterias and the relation to fertility. *Err: Journal of Dairy Science*. Vol. 32 (1949); p.543-548.

BARHT, A.D., and OKO, R.J. Abnormal

- Morphology of Bovine Spermatozoa. Ames: Iowa State University, 1989. 283 p.
- BLANCHARD, T.L. Use of a semen extender
 BORYCZKO, Z. Influencia de la *Ps. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y tipos de *E. coli* en los procesos metabólicos y de vitalidad de los espermatozoides. *Er. Zuchtygiene*. Vol. 17 (1982); p.13 Citado por MARTÍNEZ, A.E., PERAZA, N. y GARCÍA, P. Análisis bacteriológico del semen y fomites. *Er. Revista Cubana de Reproducción Animal*. Vol. 13, No.1 (1987); p.91-102.
- BRADLEY, A.J., and GREENT, M.J. Physiology and management: a study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. *Er. Journal of Dairy Science*. Vol. 83 (2000); p1957-1965.
- COTRINO, V. Microorganismos del tracto genital de reproductores bovinos. *Er. División Veterinaria Specia*, (1976).
- DOAK, G.A. CSS Implementation of new antibiotic combination. *Er. TECHNICAL CONFERENCE (NAAB) (11:1986)*. Proceedings of Technical Conference. S.I. : The Conference, 1986. p. 42-43. Citado por ERICSSON, S.A. Flow cytometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa processed using a new antibiotic combination. *Er. Theriogenolgy*. Vol. 33, No.6, (1990); p.1211-1219.
- DOWELL, V.R., and HAWKINS, T.M., eds. Laboratory methods in anaerobic bacteriology, Atlanta, GA.: Departament Health, Education, and Welfare, Public Health Service, 1977. 96p. Citado por: VARNER, D.D. *et al*. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in containing antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomona aeruginosa*. *Er. Therio-genology*. Vol.28, No.4 (1987); p.541-545.
- semen extenders. *Er. Theriogenolgy*. Vol. 50 (1998); p.559-573.
- EDMONDSON, J.E., TALLMAN, K.L., and HERMAN, H.A. A Study of the types of bacteria in bovine semen and their effect upon motility. *Er. Journal of Dairy Science-* Vol. 31 (1948); p.681.
- ELLIOT, F.I. , MURPHY, D.M., and BARTLETT, D.E. The use of polymyxin B sulfate with dehydrostreptomycin and penicillin for the control of *Vibrio fetus* in a frozen semen process. *Er. INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION (4:1961:The Hague)*. Proceedings IV International Congress Animal Reproduction. s.l.: The Congress, 1961. p539-541. Citados por ERICSSON, S.A. *et al*. Flow cytometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa processed using a new antibiotic combination. *Er. Theriogenolgy*. Vol. 33, No. 6(1990); p.1215.
- ESPINAL T, S. Zonas de vida, formaciones vegetales de Antioquia. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 1977. 135p.
- GUNSALUS, I.C., SALISBURY, G.W., and WILLETT, E.L. The bacteriology of bull semen. *Er. Journal of Dairy Science*. Vol. 24 (1941); p.911-919.
- HAMDY, A.H., and MILLER, C.C. Antibiotics for bovine nycoplasmas. *Er. Journal of Dairy Science*. Vol. 54 (1971); p 1541-1544.
- HIRTH, R.S., PLASTERIDGE, W.H., and TOURTELLOTTE, M.E. Survival of

- mycoplasma in frozen bovine semen. *En: American Journal of Veterinary Research*. Vol. 28 (1967); p.97-99. Citados por: HOLZMANN, A.; LABER, G., and GUMHOLD, G. Tiamulin, a new antibiotic for eliminating Mycoplasmas from bovine serum. HOLZMANN, A., LABER, G., and GUMHOLD, G. Tiamulin, a new antibiotic for eliminating Mycoplasmas from bovine serum. 1. Investigations on spermatozoal toxicity. *En: Theriogenology*. Vol. 22, No. 3, (1984); p.237-240.
- HUGGES, J.P., ASBURY, A.C., LOY, R.G., and BURD, H.E. The occurrence of Pseudomonas in the genital tract of stallions and its effect on fertility. *En: Cornell Veterinary*. Vol. 57 (1967); p.53-69. Citados por VARNER, D.D. et al. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *En: Theriogenology*. Vol. 50 (1998); p.573.
- JOHNSON, T.L. et al. Pseudomonas infection in a stallion: a case report. *En: ANNUAL MEETING AM ASSOC EQUINE PRACTITIONERS*. Proceedings. 1980. p.111-116. Citados por VARNER, D.D. et al. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *En: Theriogenology*. Vol. 50 (1998); p.560.
- JONES, R.K. Study of the viability of *Leptospira pomona* in frozen extended bovine semen. *En: Journal of American Veterinary Medical Association*. Vol. 133 (1958); p.216-218. Citado por LORTON, S.P. et al. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. Part 3: evaluation of Fertility. *En: Theriogenology*. Vol. 29, No. 3 (1988); p.609.
- KRZYSZKOWSKY, K.N. and PAWLOW, G.N. Beiträge zur biologie der spermatozoen. 1. Investigations on spermatozoal toxicity. *En: Theriogenology*. Vol. 22, N°3, (1984); p.237.
- En: Ztschr. F. Tierzücht u. Züchtungsbiol*. Vol. 10 (1927); p.257-283. Citados por GUNSALUS, I.C.; SALISBURY, G.W., and WILLETT, E.L. The bacteriology of bull semen. *En: Journal of Dairy Science*. Vol. 24 (1941); p.911-919.
- LENNETTE, E.H., SPAULDING, E.H., and TRUANT, J.P., ed. Manual of clinical microbiology. 2ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985, 70p. Citados por VARNER, D.D. et al. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *En: Theriogenology*. Vol. 50 (1998); p.559.
- LORTON, S.P. et al. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. Part 3: evaluation of fertility. *En: Theriogenology*. Vol. 29, N° 3, (1988); p. 609-614.
- LUCET, A. Recherches bacteriologique sur la suppuration chez les animaux de l'espèce bovine. *En: Ann. Inst. Past*. Vol. 7 (1893); p. 325-330. Citado por: GUNSALUS, I.C., SALISBURY, G.W., and WILLETT, E.L. The bacteriology of bull semen. *En: Journal of Dairy Science*. Vol. 24 (1941); p.913.
- MARINOV, P. Influence de certains microorganismes sur l'activité de la deshydrase et l'activité vitale des spermatozoïdes. *En: Veterenarno Medicinski Nauki*. Vol. 4 (1967); p.65. Citado por: MARTINEZ, A.E., PERAZA, N y GARCIA, P. Análisis bacteriológico del semen y fomites. *En:*

Revista Cubana de Reproducción Animal. Vol. 13, No. 1 (1987); p.91.

MARTINEZ, A.E. Estudio comparativo de tres soluciones desinfectantes usadas en lavados prepuciales para disminuir la contaminación bacteriana en semen. *En:* Revista Cubana de Reproducción Animal. Vol. 12, No. 2 (1986); p.51-57.

_____. Análisis bacteriológico del semen y fomites. *En:* Revista Cubana de Reproducción Animal. Vol. 13, N°.1, (1987); p.91-102.

MARTÍNEZ; PERAZA, N y GARCIA, P. Evaluación bacteriológica de semen bovino. Part 3: Sementales de los cruces 3/4 Holstein x 1/4 Cebú, 5/8 Holstein x 3/8 St Gertrudis, 5/8 Holstein x 3/8 Criollo y 3/4 Limousin x 1/4 Criollo. *En:* Revista Cubana de Reproducción Animal. Vol. 11, No. 2, (1985); p.75-83.

MAULE, J., and HU, P. Semen of animals and artificial insemination. s.l.: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1962, p. 97-108. Citados por HOLZMANN, A., LABER, G., and GUMHOLD. G. Tiamulin, a new antibiotic for eliminating Mycoplasmas from bovine serum. 1. Investigations on spermatozoal toxicity. *En:* Theriogenology. Vol. 22, N°. 3, (1984); p.239.

MERKT, H. *et al.* Recent observations concerning Klebsiella infections in stallions. *En:* Journal of Reproduction and Fertility. Vol. 23 Supplement (1975); p.143-145: Citados por VARNER, D.D. *et al.* Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *En:* Theriogenology. Vol 50 (1998); p.559.

NAPOLIS, E. *et al.* Microorganismos aislados en secreciones del aparato reproductor de sementales bovinos. *En:* Ciencia y Técnica en la Agricultura. Veterinaria. Vol. 9, No. 1 (1987); p19 -30.

OGNIANOV, A. La Carica batterica nello sperma bovino ottenuto strumentalmente nella pratica della fecondazione artificiale: The bacterial content of bovine semen collected for artificial insemination. Milano: Instituto Sperimentale Italiano. "L. Spallanzani" per la Fecundazione Artificiale. 1942. P. 48-49. Original no consultado resumen en: Animal Breeding Abstracts: Vol. 15 (1947); p. 86-87. Citado por PRINCE, P.W. *et al.* Bacteriological studies of bovine semen. Part II. The incidence of specific types of bacteria and the relation to fertility. *En:* Journal of Dairy Science. Vol. 32 (1949); p. 849.

PRINCE, P.W. *et al.* Bacteriological studies of bovine semen. Part II. The incidence of specific types of bacteria and the relation to fertility. *En:* Journal of Dairy Science. Vol. 32 (1949); p. 849-855.

- ROEMMELE, O. Biologische und physiologische untersuchungen am sperma und am scheidensekret des rindes im hinblick auf die künstliche besamung. *Er: Zool. Jahrb. Abt.f.Allg. Zool.u. Physiol.* Vol. 44 (1927); p. 85-148. Citado por GUNSALUS, I.C., SALISBURY, G.W., and WILLETT, E.L. The bacteriology of bull semen. *Er: Journal of Dairy Science.* Vol. 24 (1941); p.911.
- ROBERTS, S.J. Obstetricia veterinaria y patología de la reproducción (Teriogenología). Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1979. 1021p.
- RUNCEANU, L., *et al.* Creatariprivind flora SPALLANZANI, M. Experience pour servir a l'histoire de la generation des animaux et des plantes. Geneva: Barthelemi Chirol, 1785. p.413 Citado por GUNSALUS, I.C., SALISBURY, G.W., and WILLETT, E.L. The bacteriology of bull semen. *Er: Journal of Dairy Science.* Vol. 24 (1941); p.911.
- STATISTICAL GRAPHICS CORPORATION. Statgraphics Statistical Graphics System. Plus Ware Company. Estados Unidos: The Corporation, 1985. 937p.
- SULLIVAN, J.J. *et al.* Further studies on use of poliomixín B sulfate with dihydrostreptomycin and penicillin for control of *vibrio fetus* in a frozen semen procces. *Er: Journal of Dairy Science.* Vol. 49 (1966); p. 1659-1671.
- UCHIGAKI, S. Biological research of sterility. Part I: Influence of various Bacillus Aprobado para su publicación Mayo 2 de 2002.
- bacteriana aeroba din sperma bruta próaspata de la taurii de reproductic. *Er: Zootechnic Medicine Veterinaria .* Vol. 230 (1973) Citados por: MARTINEZ, E.A. Análisis bacteriológico del semen y fomites. *Er: Revista Cubana de Reproducción Animal.* Vol. 13, No. 1 (1987); p.91.
- SHIN, S., LEIN, D.H., and PATTEN, V. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1. Control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus*, *Haemophilus somnus*. *Er: Theriogenology.* Vol. 29 (1988); p.577-591.
- toxins on spermatozoa. *Er: Japanese Jour. Obstetr. And Gynecol.* Vol. 10 (1927); p.5-19. Citado por: por PRINCE, P.W. *et al .* Bacteriological studies of bovine semen. Part II: The incidence of specific types of bacteria and the relation to fertility. *Er: Journal of Dairy Science.* Vol. 32 (1949); p.850.
- VARNER, D.D., *et al.* Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Er: Theriogenolgy.* Vol. 50 (1998); p.559-573.
- VISSER, I.J., LAAK, E.A., and JANSEN, H.B. Failure of antibiotics gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. *Er: Theriogenology.* Vol. 51, No. 4, (1999); p. 689-697.